

*Determinar la concentració plasmàtica de TNF- $\alpha$  i dels seus receptors en nounats amb signes d'infecció i analitzar si la determinació d'aquestes citocines pot ser utilitzada com un marcador de sèpsia neonatal precoç i factor pronòstic de l'evolució clínica*

### 4.2.1. Característiques de la població d'estudi

L'estudi va incloure 170 nounats els quals es van dividir en tres grups diferents: controls sans, nounats amb sèpsia clínica o provada i nounats amb xoc sèptic.

El grup control va constar de 126 nadons amb una mediana d'edat gestacional de 38 setmanes (rang de 22 a 42 setmanes) i una mediana de pes al naixement de 2.960 g (rang de 750 a 4.150 g). Dels nounats d'aquest grup, 38 varen ser prematurs i 78 a terme. No es van trobar diferències quant a les concentracions de TNF- $\alpha$  i dels seus receptors solubles entre nounats control preterme i nounats control a terme.

El grup de sèpsia va incloure 38 nounats dels quals, 15 van ser prematurs i 23 a terme. La mediana d'edat gestacional d'aquest grup va ser de 39 setmanes (rang de 29 a 42 setmanes) i la mediana del pes de naixement va ser de 3.150 g (rang de 1.200 a 4.350 g). L'hemocultiu va ser positiu en 19 pacients, principalment per *Streptococcus agalactiae*. *Listeria monocitogenes*, un microorganisme intracel·lular grampositiu, va ser el responsable d'un cas de xoc sèptic. D'altra banda, 9 nounats amb sèpsia confirmada i xoc sèptic van presentar concentracions extremament altes de TNF- $\alpha$  mentre que els nivells de PCR van ser normals (inferiors a 12 mg/l). Cal afegir que en tres nounats amb bacterièmia sense signes ni símptomes d'infecció, els valors de TNF- $\alpha$  van ser similars als dels controls. Tots 6 pacients amb xoc sèptic van ser prematurs i van morir per un fracàs multiorgànic irreversible. Les dades clíniques dels 6 nadons amb xoc sèptic i dels 13 que van presentar sèpsia confirmada es mostren a la taula 4.10.

Taula 4.10. Dades clíniques del grup de pacients amb hemocultiu positiu.

Pacients amb sèpsia bacteriològicament positiva							
Pacient	EG (setm)	PN (g)	Sexe	WBC (cèl/mm <sup>3</sup> )	I/T ràtio	PCR (mg/l)	Hemocultiu
1	32	1.330	f			< 12	<i>H. influenzae</i>
2	40	3.900	m	30.100	0,14	> 12	<i>S. agalactiae</i>
3	34	2.400	m	3.900	0,37	< 12	<i>S. pneunoniae</i>
4	39	3.350	m	28.019	0,13	24	<i>S. agalactiae</i>
5	39	3.050	f	2.857	0,43	218	<i>S. agalactiae</i>
6	38	3.100	f	4.700	0,4	< 12	<i>S. agalactiae</i>
7	38	2.800	f	25.294	0,06	159	<i>S. agalactiae</i>
8	32	1.700	m	16.200	0,25	4	<i>Enterobacter</i>
9	29	1.275	m	6.601	0,04	< 12	<i>Enterobacter</i>
10	41	3.050	m	12.718	0,48	61	<i>S. agalactiae</i>
11	38	3.370	m	32.200	0,05	2	<i>S. agalactiae</i>
12	41	3.500	m	17.524	0,04	81	<i>S. agalactiae</i>
13	41	4.350	m	22.800	0,1	49	<i>S. agalactiae</i>

Pacients amb xoc sèptic							
Pacient	EG (setm)	PN (g)	Sexe	WBC (cèl/mm <sup>3</sup> )	I/T ràtio	PCR (mg/l)	Hemocultiu
1	26	700	m			17,9	<i>E. coli</i>
2	30	1.300	f	3.400	0,08	< 12	<i>Klebsiella</i>
3	36	2.590	f	4.149	0,72	< 12	<i>S. agalactiae</i>
4	30	1.550	m	5.740	0,44	> 12	<i>Listeria</i>
5	36	2.350	f	4.000	0	< 12	<i>S. agalactiae</i>
6	25	810	f	3.333	0,2	> 12	<i>H. influenzae</i>

EG, edat gestacional; PN, pes de naixement; WBC, recompte leucocitari; I/T, ràtio neutròfils immadurs/totals; PCR, proteïna C reactiva. Els valors de la PCR expressats com a > o < 12 van ser determinats amb un mètode semiquantitatiu.

#### **4.2.2. Determinació de les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$**

La concentració plasmàtica de TNF- $\alpha$  es va analitzar en els 170 nounats distribuïts en els tres grups anteriorment descrits.

La concentració en plasma del TNF- $\alpha$  es va determinar mitjançant un assaig immunoradiomètric, tal com es descriu en l'apartat de materials i mètodes.

Els resultats obtinguts van mostrar que les concentracions de TNF- $\alpha$  estan incrementades en els nounats amb sèpsia ( $n = 38$ ; mediana, 33,2 pg/ml; rang, 9 a 593,6) respecte del grup control ( $n = 126$ ; mediana, 10,3 pg/ml; rang, 0,6 a 46,2). Les concentracions plasmàtiques més elevades es van trobar en el grup de pacients amb xoc sèptic ( $n = 6$ ; mediana, 624,3 pg/ml; rang 124,1 a 3.204). Aquests resultats van mostrar diferències significatives respecte del grup control ( $P < 0,0000$ ) i al grup de nounats amb sèpsia ( $P < 0,0002$ ).

Dels 12 nounats amb sèpsia que van presentar concentracions de TNF- $\alpha > 100$  pg/ml en les primeres 24 hores de vida, només van sobreviure 6 (50% de supervivència). Inversament, tots els pacients amb nivells plasmàtics de TNF- $\alpha < 100$  pg/ml van presentar una bona evolució clínica.

#### **4.2.3. Determinació de les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75**

Les concentracions plasmàtiques d'ambdós receptors solubles es van determinar mitjançant la tècnica d'ELISA tal com es descriu en l'apartat de materials i mètodes

A causa de la limitació en l'obtenció de sang dels neonats, la determinació dels receptors solubles es va fer en 88 nounats i els resultats obtinguts es descriuen a la taula 4.11.

L'anàlisi estadística va mostrar que les concentracions plasmàtiques d'ambdós receptors solubles estan incrementades en els nounats amb sèpsia en comparació amb el grup control (p55:  $P < 0,0000$ ; p75:  $P < 0,003$ ). Les concentracions plasmàtiques d'aquests receptors estaven marcadament augmentades en els pacients amb xoc sèptic respecte de les

del grup control (p55:  $P < 0,003$ ; p75:  $P < 0,003$ ) i de les dels nounats amb sèpsia (p55:  $P < 0,006$ ; p75:  $P < 0,008$ ) (figura 4.5). Addicionalment, no es van trobar diferències entre els pacients amb sèpsia gramnegativa i grampositiva en les seves concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  i de sTNFR-p55 o p75.

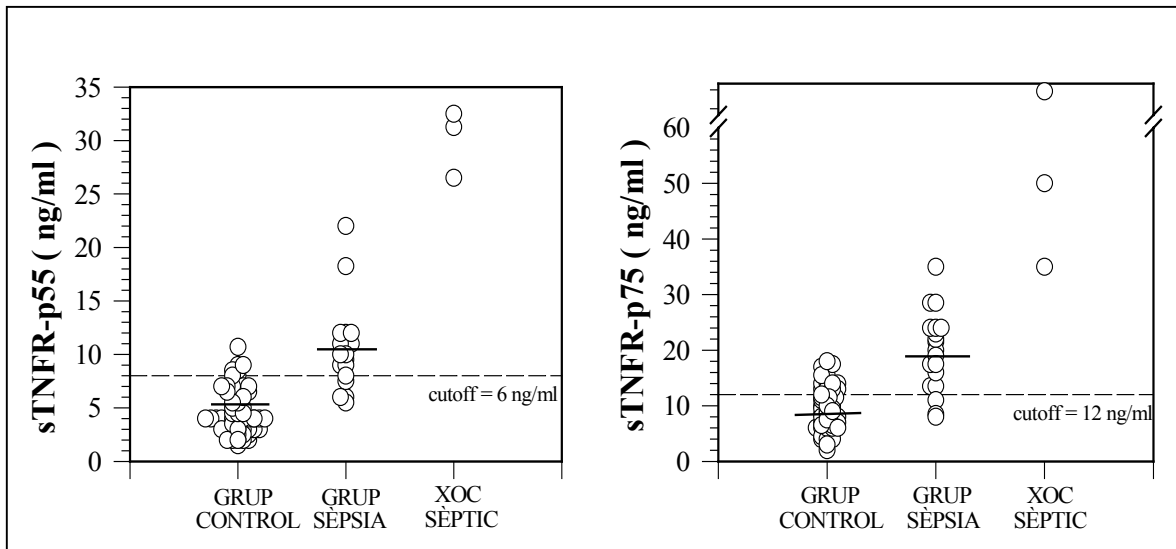
**Taula 4.11. Concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i del sTNFR-p75 (ng/ml).**

	<i>n</i>	sTNFR-p55		sTNFR-p75	
		mediana (ng/ml)	rang	mediana (ng/ml)	rang
<b>Controls</b>	66	3,9	(1,6 - 10,7)	9,2	(2,2 - 18,2)
<b>Nounats amb sèpsia</b>	19	<b>10,2*</b>	(5,5 - 22,2)	<b>20*</b>	(8,2 - 35,2)
<b>Nounats amb xoc sèptic</b>	3	<b>31,2*</b>	(26,5 - 32,5)	<b>50*</b>	(35 - 162,5)

\*  $P < 0,05$

Els nivells plasmàtics del sTNFR-p55 es van correlacionar amb els del sTNFR-p75 ( $r = 0,82$ ,  $P < 0,000$ ; Spearman  $\rho$ ). Les dades obtingudes també van mostrar l'existència d'una correlació lineal positiva entre la concentració de TNF- $\alpha$  i els nivells, mesurats simultàniament, de sTNFR-p55 ( $r = 0,9$ ,  $P < 0,000$ ; Spearman  $\rho$ ) i de sTNFR-p75 ( $r = 0,85$ ,  $P < 0,000$ ; Spearman  $\rho$ ). Tanmateix, aquesta correlació entre els valors de TNF- $\alpha$  i els dels seus receptors solubles es perdia quan la concentració de TNF- $\alpha$  era superior a 100 pg/ml. D'altra banda, es va analitzar la relació entre el recompte leucocitari, la ràtio de neutròfils immadurs/totals, la PCR, el TNF- $\alpha$ , el sTNFR-p55 i el sTNFR-p75, si bé, no es va trobar cap correlació significativa entre aquests paràmetres.

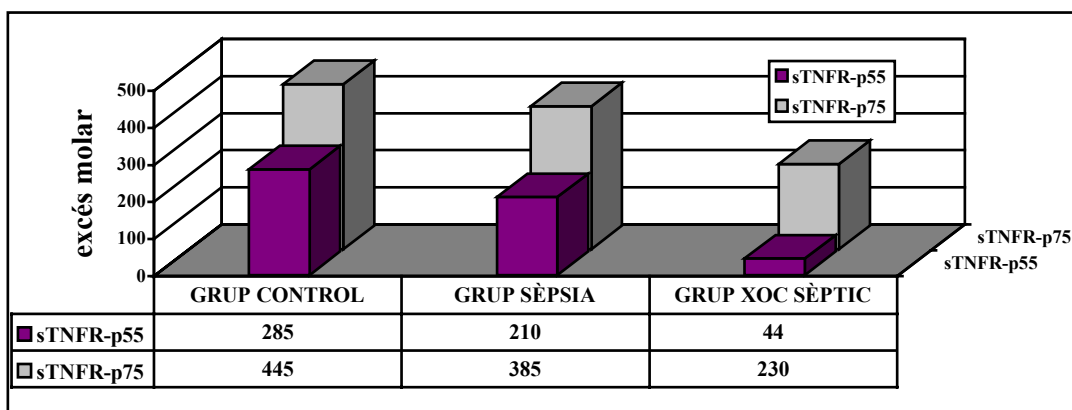
Figura 4.5. Concentracions plasmàtiques individuals dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 en els tres grups de pacients.



La línia discontinua (---) representa el valor del punt de tall per a cada sTNFR. Les medianes de les concentracions dels receptors sTNFR-p55 i p75 estan representades per línies curtes.

L'excés molar dels receptors solubles respecte del TNF- $\alpha$  en els nounats amb xoc sèptic va ser 44 vegades superior (rang de 37 a 230) per al sTNFR-p55 i 230 vegades (rang de 70 a 250) per al sTNFR-p75, comparat amb 285 (rang de 185 a 475) i 445 (rang de 250 a 1190) respectivament en el grup control, la qual cosa indicava un descens substancial en l'excés molar en els pacients amb xoc sèptic (p55:  $P < 0,02$ ; p75:  $P < 0,009$ ). L'excés molar calculat en els nounats amb sèpsia sense xoc (sTNFR-p55: mediana, 210, rang de 160 a 550; sTNFR-p75: mediana, 385, rang de 240 a 660) no va diferir del presentat en el grup control (figura 4.6).

Figura 4.6. Gràfic de l'excés molar dels sTNFR respecte del TNF- $\alpha$  en cadascun dels grups de pacients.



#### **4.2.4. Anàlisi de la sensibilitat i de l'especificitat de les concentracions del TNF- $\alpha$ i dels seus receptors solubles com a factor predictiu de sèpsia neonatal**

A fi d'establir un llindar de normalitat per a les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  i de sTNFR es va determinar el punt de tall que millor discriminava entre pacients amb sèpsia i controls sans.

Els resultats van mostrar que una concentració plasmàtica de TNF- $\alpha$  superior a 30 pg/ml és altament indicativa d'infecció en nounats durant les primeres 24 hores de vida. Com a predictor de sèpsia, aquest valor de 30 pg/ml tenia una especificitat del 96%, un valor predictiu positiu del 85% i un valor predictiu negatiu del 89%, tanmateix, la sensibilitat només era del 66%.

Adicionalment, es van determinar els valors del punt de tall per a cadascun dels receptors que millor discriminava entre pacients infectats i controls sans. El punt de tall per a l'sTNFR-p55 va ser de 8 ng/ml, i va resultar en una sensibilitat del 77,3% i una especificitat del 91%, el valor predictiu positiu va ser del 74% i el valor predictiu negatiu del 92,3%. Per a l'sTNFR-p75, un valor igual o superior a 12 ng/ml, proporcionava una sensibilitat del 86,4% i una especificitat del 71,2%. El valor predictiu positiu va ser del 50% i el valor predictiu negatiu, del 94%.

Utilitzant un valor de TNF- $\alpha$  igual o superior a 30 pg/ml conjuntament amb un valor igual o superior a 8 ng/ml pel sTNFR-p55 o de 12 ng/ml pel sTNFR-p75, la sensibilitat i l'especificitat resultant del test va ser del 100% i del 82%, respectivament. Quan el test era positiu la probabilitat de sèpsia neonatal va ser del 70% i el valor predictiu negatiu, del 100% (taula 4.12).

Taula 4.12. Valor diagnòstic del TNF- $\alpha$  i dels sTNFR.

Test	Sensibilitat	Especificitat	VPP*	VPN*
▪ TNF- $\alpha$ $\geq$ 30 pg/ml	66%	96%	85%	89%
▪ sTNF-p55 $\geq$ 8 ng/ml	77,3%	91%	74%	92,3%
▪ sTNF-p75 $\geq$ 12 ng/ml	86,4%	71,2%	50%	94%
▪ TNF- $\alpha$ $\geq$ 30 pg/ml i sTNF-p55 $\geq$ 8 ng/ml o TNF- $\alpha$ $\geq$ 30 pg/ml i sTNF-p75 $\geq$ 12 ng/ml	100%	82%	70%	100%

\*VPP, valor predictiu positiu; \*VPN, valor predictiu negatiu.

#### 4.2.5. Anàlisi de la correlació entre la modulació dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 i l'evolució clínica de la sèpsia neonatal

En un grup de 7 pacients amb sèpsia i 10 nounats controls es va determinar de forma simultània la concentració plasmàtica de sTNFR-p55 i de sTNFR-p75 al car de 24, 48 i 72 hores de vida (figures 4.7 i 4.8). Els resultats van mostrar que en pacients amb sèpsia, les concentracions del receptor sTNFR-p75 van romandre significativament augmentades durant les primeres 48 hores de vida i es van normalitzar després del tercer dia de tractament en paral·lel amb la millora clínica. Les concentracions plasmàtiques del receptor sTNFR-p55 van disminuir més ràpidament, i van retornar als valors normals al cap de 48 hores.

La valoració clínica dels nadons es va realitzar utilitzant l'*Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP)*, mètode validat com a índex de severitat de malaltia neonatal. Les concentracions plasmàtiques d'ambdós receptors del TNF- $\alpha$  en pacients amb sèpsia es van correlacionar amb la gravetat de la malaltia (p55-SNAP:  $r = 0,80$ ,  $P < 0,000$ ; p75-SNAP:  $r = 0,87$ ,  $P < 0,003$ ).



Figura 4.7. Determinacions seriades del receptor sTNFR-p55.

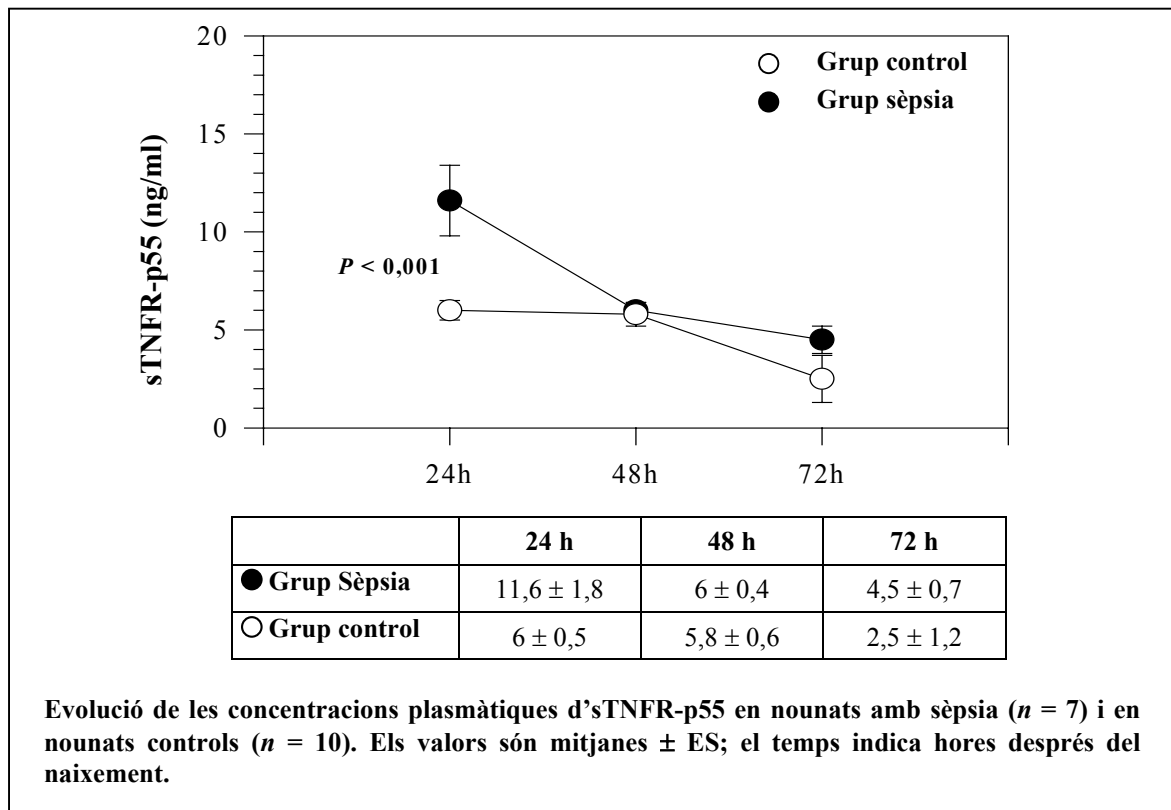
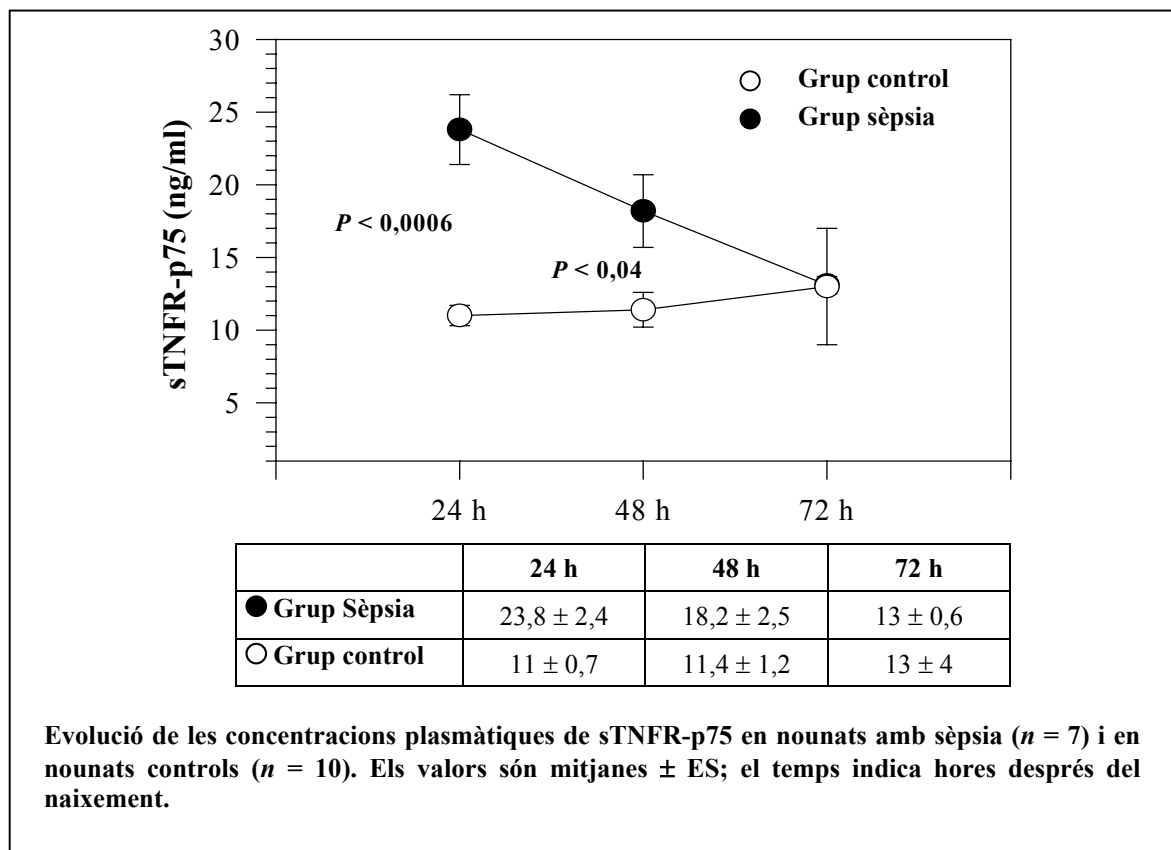


Figura 4.8. Determinacions seriades del receptor sTNFR-p75.



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

### 4.3.1. Característiques de la població d'estudi

Tal com es comenta a l'apartat de "Material i mètodes", per caracteritzar l'associació del part preterme, de la ruptura prematura de membranes (RPM) preterme i de la preeclàmpsia amb el polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$ , vam fer un estudi de cohorts amb dones admeses a la Unitat de Ginecologia i Obstetrícia des de l'any 1997 fins l'any 2000. Per a la caracterització d'aquest polimorfisme en la població espanyola es van recollir mostres de donants de sang del nostre hospital durant el mateix període de temps.

L'estudi es va realitzar amb un total de 381 mostres que es van dividir en els grups següents:

- Un grup control de la població general espanyola, constituït per un total de 101 mostres corresponents a 45 homes i 56 dones.
- Un grup control de 127 dones que van tenir un part a terme després d'una gestació sense complicacions.
- Un grup de 126 pacients que havien presentat parts prematurs precedits per una RPM o amenaça de part preterme (APP). Per a l'anàlisi, aquest grup de pacients es va subdividir atenent els criteris que es detallen a continuació:
  - Un grup de 37 dones que van presentar RPM amb part preterme.
  - Un grup de 89 dones que van presentar APP amb membranes íntegres. De forma addicional, l'anàlisi dels resultats d'aquest grup es va realitzar estratificant les pacients segons la seva resposta al tractament tocolític inhibitori del part:
    - Un grup de 66 dones sense resposta al tractament tocolític i que per tant van presentar un part preterme.
    - Un grup de 23 dones amb bona resposta al tractament amb part diferit a terme.
- Un grup de 27 dones amb preeclàmpsia. Dels 27 casos inclosos en aquest grup, 10 van presentar un part preterme i 17, a terme.

Com a causes d'exclusió es va tenir en compte: gestacions múltiples, malformacions fetals, retard de creixement intrauterí, diabetis *mellitus* i diabetis gestacional, drogaaddicció, obesitat mòrbida i haver presentat despreniment de placenta. En el grup control de parts a terme es van eliminar tots els casos que havien presentat un part preterme amb anterioritat. En el grup d'APP amb parts preterme es van excloure també tots els casos on es va induir el part o es va practicar una cesària electiva.

A la taula següent es mostra un resum de les característiques demogràfiques i clíniques principals de cada grup:

	<b>Edat materna (anys)</b> (mediana, rang)	<b>Edat gestacional (setm.)</b> (mediana, rang)	<b>Nº embarassos</b> (mediana, rang)
Controls ( <i>n</i> = 127)	29,18 (19-42)	39,8 (38-42)	1,4 (1-4)
RPM amb part preterme ( <i>n</i> = 37)	27,5 (20-37)	34,2 (31-36)	1,5 (1-2)
APP amb part preterme ( <i>n</i> = 66)	27 (18-35)	34,7 (27-36)	1,6 (1-3)
APP amb part a terme ( <i>n</i> = 23)	28 (19-40)	38,9 (37-42)	1,5 (1-3)
Preeclàmpsia ( <i>n</i> = 27)	30,4 (25-43)	36,7 (27-41)	1,4 (1-3)

No s'han trobat diferències ni amb l'edat materna ni amb el nombre d'embarassos entre els diferents grups de pacients i controls.

### 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.

#### 4.3.2.1. Anàlisi de la freqüència dels al·lels TNFA1 i TNFA2

Utilitzant la tècnica de l'AS-PCR es va determinar la freqüència al·lèlica del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  en la població espanyola. L'anàlisi d'aquest polimorfisme es va realitzar en 101 individus normals donants de sang (45 homes i 56 dones) del nostre hospital.

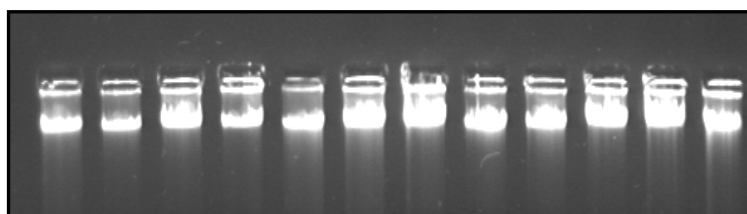


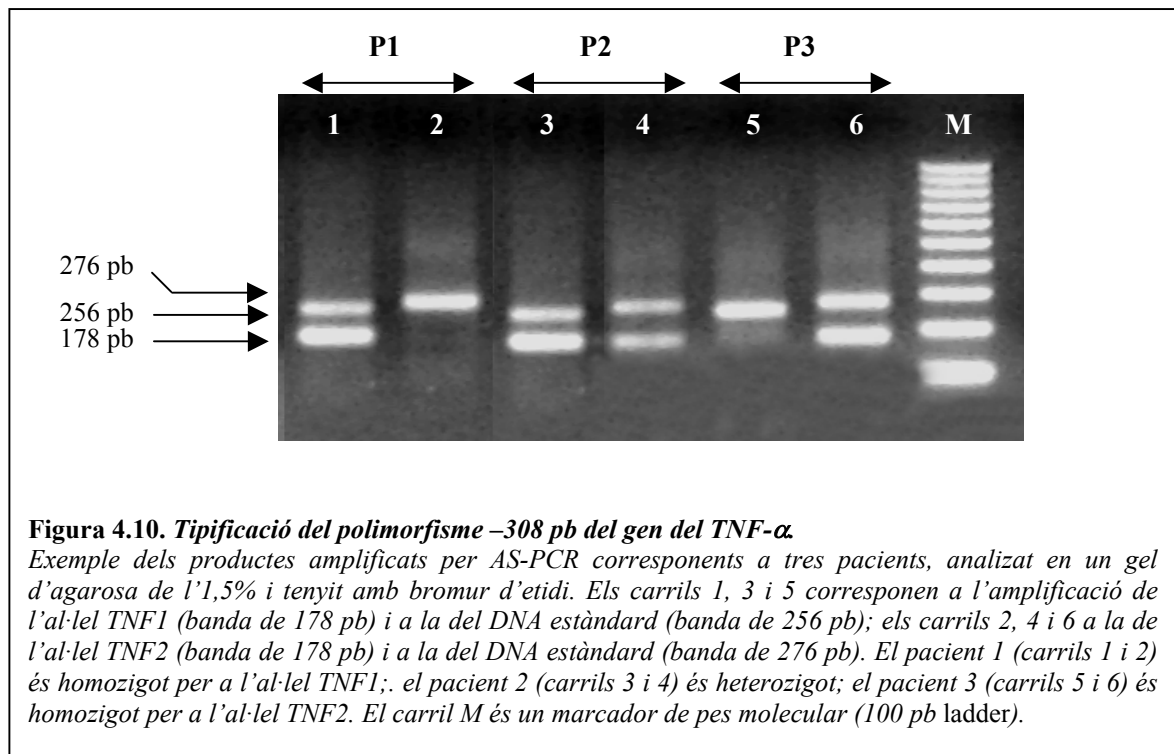
Figura 4.9. Visualització d'un gel d'agarosa del 0,8% on s'han sotmès a electroforesi diferents mostres de DNA genòmic obtingut pels procediments exposats a l'apartat de "Material i mètodes".

Segons els resultats obtinguts, en la població espanyola la freqüència al·lèlica del TNFA1 és de 0,84 i de 0,16 per l'al·lel TNFA2 (taula 4.13), i a més a més, la seva distribució és consistent amb l'equilibri de Hardy-Weinberg.

Taula 4.13. Freqüències genotípiques i al·lèliques del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  en la població espanyola.

Població espanyola ( $n_1 = 101$ )			
Genotip TNF	$n_1$	%	Freqüències al·lèliques ( $n_2 = 202$ )
TNFA1/TNFA1	70	70	TNFA1 ( $n_2 = 170$ ) 0,84
TNFA1/TNFA2	30	29	TNFA2 ( $n_2 = 32$ ) 0,16
TNFA2/TNFA2	1	1	

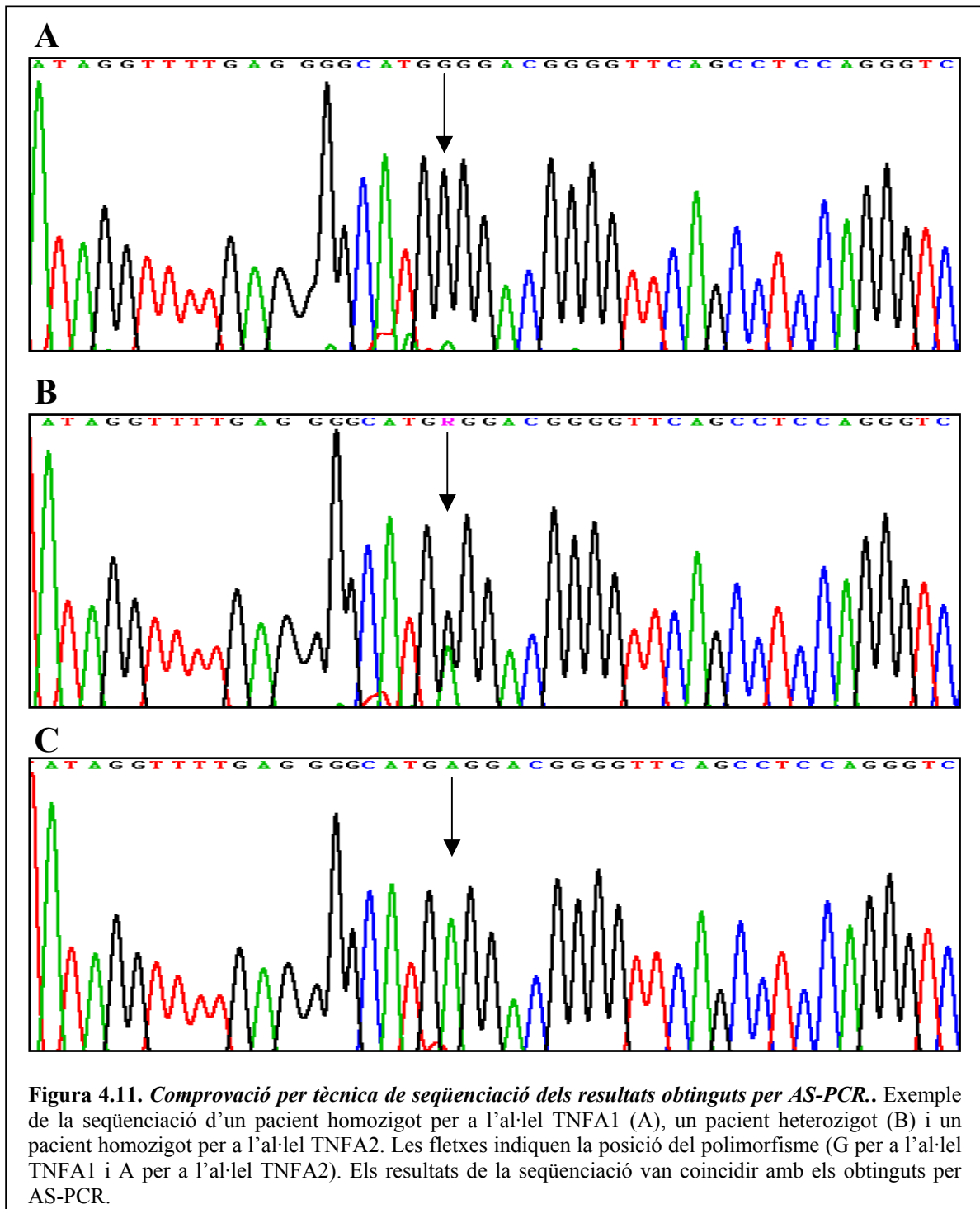
$n_1$  = nombre d'individus analitzats;  $n_2$  = nombre de cromosomes



Quan es compara la distribució del polimorfisme en la població espanyola amb les freqüències estimades per altres autors en poblacions d'origen caucàsic o africà no s'observen diferències significatives (taula 4.14). Això no obstant, quan les freqüències es comparen amb les descrites en població asiàtica sí que hi ha diferències significatives ja que aquesta presenta un increment en la freqüència de l'al·lel TNFA1 i un descens en la freqüència de l'al·lel TNFA2.

**Taula 4.14. Dades de les freqüències al·lèliques del polimorfisme –308 pb del TNF- $\alpha$  publicades per altres poblacions.**

	al·lel TNFA1	al·lel TNFA2
<b>Població d'Europa del nord</b> <i>Wilson AG i col·l. Hum Mol Gen 1992; 1:353</i>	<b>0,84</b>	<b>0,16</b>
<b>Població turca</b> <i>Chouchane L i col·l. Cancer 1997; 80:1489-96</i>	<b>0,84</b>	<b>0,16</b>
<b>Població africana (Gàmbia)</b> <i>McGuire W i col·l. Nature 1994; 371:508-11</i>	<b>0,84</b>	<b>0,16</b>
<b>Població xinesa</b> <i>Huang S i col·l. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156:1436-39</i>	<b>0,95</b>	<b>0,05</b>
<b>Població japonesa</b> <i>Higuchi T i col·l. Tissue Antigens 1998; 51:605</i>	<b>0,91</b>	<b>0,09</b>



#### 4.3.2.2. Anàlisi d'associació dels al·lels TNFA1 i TNFA2 amb l'HLA

Ja que el gen del TNF- $\alpha$  mapa a la regió de classe III del MHC, 250 Kb centromèric de l'HLA B i 850 Kb telomèric de l'HLA-DR, vam considerar la possibilitat que hi hagués alguna associació, deguda a un desequilibri de lligament, entre els al·lels del

TNF- $\alpha$  i els antígens de l'HLA. Trobar alguna associació entre determinats al·lels de l'HLA i alguna variant del gen del TNF- $\alpha$ , sobretot si aquesta variant afecta la regulació d'aquest gen, podria explicar, almenys en part, per què determinats haplotips de l'HLA estan associats a diferents malalties autoimmunes i/o disregulacions de la resposta immunològica.

L'anàlisi d'associació dels al·lels TNFA1 i TNFA2 amb els diferents haplotips de l'HLA de classe I i de classe II s'ha realitzat en 100 individus de la població espanyola. Els resultats obtinguts es detallen en les apartats següents.

#### **4.3.2.2.1. Descripció de les freqüències al·lèliques de l'HLA en la població espanyola analitzada**

##### **▪ Freqüències al·lèliques de l'HLA de classe I**

Les freqüències al·lèliques de l'HLA de classe I en la nostra població d'estudi es descriuen a la taula 4.15. S'han trobat 16 al·lels per al locus HLA-A i 24 per al locus HLA-B. Aquests resultats indiquen l'existència d'un alt grau de polimorfisme tal com s'espera atesa l'heterogeneïtat de la nostra població d'estudi.

Tal com s'ha vist en altres poblacions europees, l'al·lel A2 va ser el més freqüent en la nostra població (0,2146). Els al·lels A1 (0,1099), A3 (0,0890) i A24 (0,1308) van ser també freqüents amb resultats similars als trobats en població europea (Tsuji K i col·l., 1991; Cavalli-Sforza LL i col·l., 1994). Cal destacar que en la població present, l'al·lel A29 (0,1047) va mostrar una alta freqüència en comparació amb altres poblacions europees. Aquest al·lel és molt freqüent a l'oest d'Europa i, en particular, en la península Ibèrica. L'al·lel A30 també mostra una alta freqüència en la població de la península Ibèrica, especialment pel que fa a bascos.

Per al locus HLA-B, en la població espanyola analitzada, l'al·lel B44 (0,1789) és el més freqüent, igual que en la majoria d'europeus, especialment a l'Europa de l'oest (Tsuji K i col·l., 1991; Cavalli-Sforza LL i col·l., 1994). El B51 (0,1211) i el B35 (0,1105) són els altres dos al·lels que estan més representats; de fet, aquests al·lels es troben també amb una alta freqüència en altres poblacions mediterrànies, com per exemple la italiana, (B51: 0,4667) i la turca (B51: 0,2813).



▪ **Freqüències al·lèliques de l'HLA de classe II**

La distribució de les freqüències al·lèliques per a l'HLA-DRB1 en la població d'estudi es descriuen a la taula 4.15. Els nostres resultats indiquen que l'al·lel més freqüent és el DRB1\*07 (0,1631) seguit dels al·lèls DRB1\*04 i DRB1\*03 (0,1316 i 0,1263, respectivament). Cal destacar que la freqüència de l'al·lel DRB1\*01 (0,1105) és relativament més alta que la descrita en altres grups estudiats, probablement a causa del nombre total de mostres. En conclusió, la distribució de les freqüències en la població estudiada no difereix essencialment de cap de les poblacions descrites de la península Ibèrica (Comas D i col·l., 1998).

**Taula 4.15.** *Freqüències al·lèliques de l'HLA-A, HLA-B i l'HLA-DRB1 en la població espanyola analitzada (n = 100).*

Al·lèls	Freqüències	Al·lèls	Freqüències	Al·lèls	Freqüències
<b>HLA-A</b>		B14	0,0789	<b>HLA-DRB1</b>	
A1	0,1099	B18	0,0368	DRB1*01	0,1105
A2	0,2146	B27	0,0211	DRB1*03	0,1263
A3	0,0890	B35	0,1105	DRB1*04	0,1316
A11	0,0628	B37	0,0211	DRB1*07	0,1631
A23	0,0209	B38	0,0211	DRB1*08	0,0316
A24	0,1308	B39	0,0105	DRB1*09	0,0158
A25	0,0157	B41	0,0105	DRB1*10	0,0210
A26	0,0366	B44	0,1789	DRB1*11	0,0842
A29	0,1047	B45	0,0053	DRB1*12	0,0158
A30	0,0628	B46	0,0053	DRB1*13	0,1158
A31	0,0314	B49	0,0211	DRB1*14	0,0368
A32	0,0471	B50	0,0368	DRB1*15	0,1053
A33	0,0261	B51	0,1211	DRB1*16	0,0421
A34	0,0052	B52	0,0105		
A66	0,0052	B55	0,0158		
A68	0,0366	B57	0,0316		
		B58	0,0211		
<b>HLA-B</b>		B60	0,0316		
B7	0,0684	B62	0,0316		
B8	0,0789	B63	0,0158		
B13	0,0158				

▪ **Anàlisi dels haplotips**

El gran nombre de loci tipificats produeix un gran nombre d'haplotips diferents on fins i tot els més freqüents es troben en freqüències molt baixes, cosa que en dificulta l'estimació. És per aquest motiu que ens hem centrat en l'anàlisi d'haplotips de classe I. Posteriorment, s'han analitzat els principals desequilibris de lligament entre els al·lels de classe I i de classe II descrits en població caucàsica.

Un resum dels resultats principals derivats de l'anàlisi de les freqüències haplotípiques es presenta a la taula 4.16.

**Taula 4.16. Freqüències dels haplotips més comuns trobats en la població espanyola analitzada (n = 100).**

<b>Haplotips de l'HLA de classe I (HLA-A i HLA-B)</b>			
Haplotip	Freqüències	Haplotip	Freqüències
A29-B44	0,0789	A3-B7	0,0210
A2-B44	0,0684	A3-B51	0,0210
A2-B51	0,0684	A30-B18	0,0210
A1-B8	0,0579	A2-B15	0,0158
A2-B35	0,0368	A3-B35	0,0105
A30-B35	0,0368	A3-B8	0,0105
A24-B35	0,0316		
<b>Haplotips de l'HLA de classe I i II</b>			
Haplotip	Freqüències	Haplotip	Freqüències
B8-DRB1*03	0,0579	B7-DRB1*02	0,0421
A1-DRB1*03	0,0526	B18-DRB1*03	0,0265
A1-DRB1*07	0,0421	B57-DRB1*07	0,0158
A29-B44-DRB1*07	0,0526	A2-B51-DRB1*11	0,0157
A1-B8-DRB1*03	0,0421	A29-B44-DRB1*03	0,0157
A1-B8-DRB1*07	0,0316	A2-B44-DRB1*11	0,0105
A2-B44-DRB1*13	0,0263		

L'haplotip de classe I A29-B44 va ser el més freqüent en la població d'estudi (0,0789). Aquest haplotip es troba també molt representat en població de l'oest d'Europa, i arriba a les freqüències més altes en població ibèrica (catalans, bascos, castellans i portuguesos). Els haplotips més freqüents a Europa, A1-B8 i A3-B7, s'han trobat a

freqüències intermèdies en la nostra població igual que s'ha descrit a la població catalana (0,0402) i basca (0,0437) (Comas D i col·l., 1998). L'haplotip A2-B44 tot i que és freqüent en poblacions europees, la freqüència trobada en la nostra població (0,0684) com també a la població catalana (0,0632) és de les més altes que s'han descrit (Comas D i col·l., 1998). L'haplotip A2-B51 és típic de les poblacions del sud d'Europa: Portugal, Grècia i Itàlia són les poblacions amb les freqüències més altes. Pel que fa a l'anàlisi de les freqüències haplotípiques entre l'HLA de classe I i II, els resultats en general també concorden amb els descrits a la població europea i, en concret, a l'espanyola.

#### 4.3.2.2.2. Anàlisi d'associació dels al·lels TNFA1 i TNFA2 amb l'HLA de classe I i de classe II

Taula 4.17. Freqüència dels al·lels TNFA1 i TNFA2 en individus tipats per a l'HLA-A ( $n = 100$ ).

HLA-A	TNFA2-		TNFA2+		$P_{corr}$	OR*	95% IC*
	$n$	%	$n$	%			
A1	12	57,1	9	42,9	NS		
A2	26	63,4	15	36,6	NS		
A3	13	76,5	4	23,5	NS		
A9	21	72,4	8	27,6	NS		
A10	10	83,3	2	16,7	NS		
A11	10	83,3	2	16,7	NS		
A28	7	100	0	0	NS		
A29	10	50	10	50	NS		
A30	11	91,6	1	8,3	NS		
A31	5	83,3	1	16,7	NS		
A32	5	55,5	4	44,4	NS		
A33	4	80	1	20	NS		

Els al·lels A23 i A24 s'han assignat com a A9. Els al·lels A25, A26, A34 i A66 s'han assignat tots com a A10. Els al·lels A68 i A69 s'han assignat com a A28. NS, no significatiu; OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

**Taula.4.18. Freqüència dels al·lels TNFA1 i TNFA2 en individus tipats per a l'HLA-B (n = 100).**

HLA-B	TNFA2-		TNFA2+		$P_{corr}$	OR*	95% IC*
	n	%	n	%			
<b>B5</b>	20	83,3	4	16,7	NS		
<b>B7</b>	10	76,9	3	23,1	NS		
<b>B8</b>	<b>2</b>	<b>13,3</b>	<b>13</b>	<b>86,7</b>	<b><math>P &lt; 0,0001</math></b>	<b>24,2</b>	<b>(5-117)</b>
<b>B12</b>	19	55,8	16	44,2	NS		
<b>B13</b>	3	100	0	0	NS		
<b>B14</b>	<b>15</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b><math>P &lt; 0,03</math></b>	<b>17,9</b>	<b>(1,9-∞)</b>
<b>B15</b>	7	77,8	2	22,2	NS		
<b>B16</b>	6	100	0	0	NS		
<b>B17</b>	6	60	4	40	NS		
<b>B18</b>	7	100	0	0	NS		
<b>B21</b>	<b>3</b>	<b>27,3</b>	<b>8</b>	<b>72,7</b>	<b><math>P &lt; 0,01</math></b>	<b>7,3</b>	<b>(1,8-31)</b>
<b>B22</b>	2	66,7	1	33,3	NS		
<b>B27</b>	3	75	1	25	NS		
<b>B35</b>	16	76,2	5	23,8	NS		
<b>B37</b>	3	75	1	25	NS		
<b>B40</b>	5	83,3	1	16,7	NS		
<b>B41</b>	2	100	0	0	NS		
<b>B46</b>	0	0	1	100	NS		

Els al·lels B38 i B39 s'han assignat com a B16. Els al·lels B44 i B45 s'han assignat com a B12. Els al·lels B49 i B50 s'han assignat com a B21. Els al·lels B51, B52 i B53 s'han assignat com a B5. Els al·lels B54 i B55 s'han assignat com a B22. Els al·lels B57 i B58 s'han assignat com a B17. Els al·lels B60 i B61 s'han assignat com a B40. Els al·lels B62 i B63 s'han assignat com a B15. NS, no significatiu; OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

Tal com mostren els resultats descrits en les diferents taules d'aquest apartat, l'al·lel TNFA2 està fortament associat amb l'HLA B8 ( $\chi^2 = 21,7$ ,  $P_{corr} < 0,0001$ ; taula 4.18), B21 ( $\chi^2 = 7,6$ ,  $P_{corr} < 0,01$ , taula 4.18) i DRB1\*03 ( $\chi^2 = 8,5$ ,  $P_{corr} < 0,009$ ; taula 4.19). En la nostra població, no s'ha trobat cap associació entre l'al·lel TNFA2 i l'HLA-A (taula 4.17), tanmateix, l'associació entre l'al·lel A29 i el TNFA2 va ratllar la significació estadística ( $\chi^2 = 4,11$ ,  $P_{corr} < 0,07$ ). Aquesta menor associació amb l'al·lel A29 probablement és deguda a la major distància física que hi ha entre l'HLA-A i el locus del TNF- $\alpha$  en comparació amb l'HLA-B.

L'al·lel TNFA1 està significativament associat amb l'HLA B14 ( $\chi^2 = 6,5$ ,  $P_{corr} < 0.03$ , taula 4.18). L'HLA DRB1\*04 i DRB1\*06 van ser específicament analitzats a causa de l'associació descrita en població de l'Europa del nord amb l'al·lel TNFA1, això no obstant, en la nostra població d'estudi no es va trobar cap associació estadísticament significativa.

**Taula 4.19. Freqüència dels al·lells TNFA1 i TNFA2 en individus tipats per l'HLA-DRB1 (n= 100).**

HLA-DRB1	TNFA2-		TNFA2+		$P_{corr}$	OR*	95% IC*
	n	%	n	%			
<b>DRB1*01</b>	17	81	4	19	NS		
<b>DRB1*02</b>	20	76,9	6	23,1	NS		
<b>DRB1*03</b>	<b>10</b>	<b>41,7</b>	<b>14</b>	<b>58,3</b>	<b><math>P &lt; 0,009</math></b>	<b>4,8</b>	<b>(1,7-13)</b>
<b>DRB1*04</b>	17	68	8	32	NS		
<b>DRB1*05</b>	14	77,8	4	22,2	NS		
<b>DRB1*06</b>	19	82,6	4	17,4	NS		
<b>DRB1*07</b>	19	61,3	12	38,7	NS		
<b>DRB1*08</b>	5	83,3	1	16,7	NS		
<b>DRB1*09</b>	2	66,7	1	33,3	NS		
<b>DRB1*10</b>	2	50	2	50	NS		

Els al·lells DRB1\*11 i DRB1\*12 s'han assignat com a DRB1\*05. Els al·lells DRB1\*13 i DRB1\*14 s'han assignat com a DRB1\*06. Els al·lells DRB1\*15 i DRB1\*16 s'han assignat com a DRB1\*02. NS, no significatiu; OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

L'anàlisi haplotípica va mostrar que l'al·lel TNFA2 està associat amb l'haplotip de l'HLA A1, B8, DRB1\*03 (test de Fisher:  $P < 0,0001$ ) amb una oportunitat relativa de 55 (95% IC: 5 –  $\infty$ ). Addicionalment es va observar una associació entre l'al·lel TNFA2 i l'haplotip HLA B8, DRB1\*07 ( $P = 0,003$ , OR = 17, 95% IC: 1,8 – 793) i amb l'haplotip HLA A29, B21 ( $P < 0,007$ , OR = 23,6, 95% IC: 1,6 –  $\infty$ ).

### 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

#### 4.3.3.1. Freqüència genotípica del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$

Les freqüències de portadors dels al·lels TNFA1 i TNFA2 en el grup de pacients i en el grup control de parts a terme es descriu a la taula 4.20.

**Taula 4.20. Percentatge de portadors dels al·lels TNFA1 i TNFA2 en els controls i en els pacients.**

	TNFA1/TNFA1		TNFA1/TNFA2		TNFA2/TNFA2	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
1. Controls de parts a terme ( <i>n</i> = 127)	95	74,8	30	23,6	2	1,6
2. Grup de pacients amb RPM preterme o APP ( <i>n</i> = 126)	88	69,8	36	28,6	2	1,6
2.1. Pacients amb RPM o APP amb signes d'infecció ( <i>n</i> = 48)	41	85,4	7	14,6	0	0
2.2. Pacients amb RPM o APP sense signes d'infecció ( <i>n</i> = 78)	47	60,2	<b>29</b>	<b>37,2</b>	<b>2</b>	<b>2,6</b>
3. Preeclàmpsia ( <i>n</i> = 27)	19	70,4	8	29,6	0	0

L'anàlisi comparativa entre el grup de pacients i el grup control de parts a terme no va mostrar cap diferència significativa en les freqüències genotípiques del polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$ .

Dins del grup de pacients hi havia dos grups clarament diferenciables atenent la presència o absència de signes d'infecció en el moment de l'ingrés o del part. Aquestes dues poblacions es van analitzar separatament per estudiar quin era l'efecte del polimorfisme en la ruptura prematura de membranes preterme o en l'amenaça de part prematur en ambdues situacions.

En el grup de pacients que no van presentar signes d'infecció, el 39,8% (*n* = 31/78) eren portadores almenys d'un al·lel TNFA2, mentre que en el grup control només hi va

haver un 25,2% de portadores ( $n = 32/127$ ). L'anàlisi comparativa de la freqüència genotípica (taula 4.20) entre el grup control i el grup de pacients sense signes d'infecció, va demostrar l'existència d'una associació entre l'al·lel TNFA2 i la RPM preterme i l'APP ( $\chi^2 = 4,14$ ,  $P < 0,031$ ). Les portadores almenys d'un al·lel TNFA2 tenen una Oportunitat relativa de 2 (95% IC: 1,02 – 3,75) de patir RPM preterme o APP comparat amb les dones homozigotes per a l'al·lel TNFA1. De les 31 pacients portadores de l'al·lel TNFA2, dues eren homozigotes per al TNFA2. En el grup control es va observar la mateixa proporció d'homozigotes per a l'al·lel TNFA2 ( $n = 2/32$ ) per la qual cosa no es va trobar cap associació entre l'homozigotat per al TNFA2 i la RPM preterme o l'APP.

D'altra banda, en el grup de pacients amb signes d'infecció es va observar una disminució de la freqüència de l'al·lel TNFA2 respecte del grup control, tot i que aquesta diferència no va ser estadísticament significativa. Això no obstant, quan es van comparar els tots dos grups de pacients, aquell amb signes d'infecció va presentar una disminució en la proporció de portadores de l'al·lel TNFA2 (14,6% *versus* 39,8%;  $P < 0,003$ ) amb una Oportunitat relativa de 3,8 (95% IC: 1,4 – 11,4).

Aquests resultats posen de manifest que en presència de signes d'infecció no es pot detectar cap associació entre l'al·lel TNFA2 i un major risc de patir RPM preterme o APP, cosa que ens va portar a pensar que aquest no era un grup adequat per analitzar la contribució del polimorfisme del TNF- $\alpha$  a la RPM preterme o a l'APP.

Per tots aquests motius, i tal com ja hem comentat, les anàlisis posteriors de l'estudi es van fer comparant únicament els controls a terme amb el grup de pacients sense signes d'infecció.

**Taula 4.21. Freqüència genotípica del polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  en els diferents subgrups de pacients i en els controls.**

	<u>TNFA1/TNFA1</u>		<u>TNFA1/TNFA2</u>		<u>TNFA2/TNFA2</u>	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
1. Controls de parts a terme ( $n = 127$ )	95	74,8	30	23,6	2	1,6
2. RPM preterme ( $n = 22$ )	11	50	<b>10</b>	<b>45,5</b>	<b>1</b>	<b>4,5</b>
3. APP ( $n = 56$ )	36	64,3	19	33,9	1	1,7
4. Preeclàmpsia ( $n = 27$ )	19	70,4	8	29,6	0	0

L'anàlisi estratificada dels subgrups de pacients (taula 4.21) va mostrar que 20 de les 56 pacients (35,7%) amb APP eren portadores de l'al·lel TNFA2, mentre que en el grup d'RPM preterme el percentatge de portadores de l'al·lel TNFA2 va ser del 50% ( $n = 11/22$ ). L'anàlisi estadística va mostrar que hi ha una associació entre l'al·lel TNFA2 i la RPM preterme ( $\chi^2 = 4,5$ ,  $P < 0,02$ ). Es va estimar que les portadores de l'al·lel TNFA2 tenien un risc tres vegades superior de patir RPM preterme que les dones homozigots per a l'al·lel TNFA1 (OR = 3, 95% IC: 1,2 – 7,5). D'altra banda, tot i que la freqüència d'homozigots per a l'al·lel TNFA2 va ser superior en el grup de RPM preterme (4,5%) en comparació amb el grup control (1,6%), no es va assolir una significació estadística.

D'altra banda, en el grup amb APP no es va trobar cap associació amb l'al·lel TNFA2. Segons aquests resultats es va dividir el grup d'APP atenent la resposta al tractament inhibitori amb tocolítics que havien presentat les pacients. En el grup de dones que no havien respost al tractament i que, per tant, havien presentat un part preterme no es va trobar cap associació amb l'al·lel TNFA2. El grup de dones que havia respost als tocolítics, diferint el part a terme, tampoc no va mostrar una associació amb l'al·lel TNFA2.

L'anàlisi dels resultats obtinguts en el grup de pacients amb preeclàmpsia no va mostrar cap associació ni amb l'al·lel TNFA1 ni amb el TNFA2.

#### **4.3.3.2. Freqüència al·lèlica del polimorfisme –308 pb del gen del TNF- $\alpha$**

Quan es van comparar les freqüències al·lèliques del polimorfisme –308 pb del TNF- $\alpha$  entre casos i controls, l'al·lel rar TNFA2 es va trobar de forma més freqüent en el grup de pacients que havien presentat RPM preterme o APP; malgrat això, aquesta comparació no va assolir una significació estadística. La freqüència al·lèlica del TNFA2 va ser de 0,21 en el grup de pacients amb RPM preterme o APP, mentre que en el grup control va ser de 0,14. En el grup de pacients amb preeclàmpsia les freqüències al·lèliques van ser iguals a la dels controls.

En l'anàlisi dels subgrups de pacients (taula 4.22) la freqüència al·lèlica del TNFA2 en el grup de dones amb RPM preterme (TNFA2: 0,27) va ser superior a la del grup control (TNFA2: 0,14), la qual cosa indica una associació estadísticament significativa



( $P < 0,03$ , OR = 2,3, 95% IC: 1,12 – 4,7). En el grup de pacients amb APP la freqüència al·lèlica del TNFA2 també va ser superior a la del grup control (TNFA2: 0,19 versus 0,14); aquesta diferència, però, no va ser estadísticament significativa.

**Taula 4.22.** *Freqüència al·lèlica del polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  en els diferents subgrups de pacients i en els controls.*

	TNFA1	TNFA2
1. Controls de parts a terme ( $n = 127$ )	0,86	0,14
2. RPM preterme ( $n = 22$ )	<b>0,73</b>	<b>0,27</b>
3. APP ( $n = 56$ )	0,81	0,19
4. Preeclàmpsia ( $n = 27$ )	0,85	0,15

#### 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

##### 4.3.4.1. Anàlisi d'associació dels al·lells TNFA1 i TNFA2 amb l'HLA de classe I i de classe II

L'anàlisi d'associació entre el polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  i els al·lells de l'HLA de classe I i de classe II es va dur a terme en una part de la nostra població d'estudi corresponent a dones control amb parts a terme ( $n = 51$ ) i a pacients amb RPM preterme i APP ( $n = 43$ ).

**Taula 4.23.** Freqüència dels al·lells TNFA1 i TNFA2 en individus tipats per a l'HLA-A ( $n = 94$ ).

HLA-A	TNFA2-		TNFA2+		$P_{corr}$	OR*	95% IC*
	$n$	%	$n$	%			
<b>A1</b>	9	50	9	50	NS		
<b>A2</b>	26	63,4	15	36,6	NS		
<b>A3</b>	8	72,7	3	27,3	NS		
<b>A9</b>	16	72,7	6	27,3	NS		
<b>A10</b>	10	66,7	5	33,3	NS		
<b>A11</b>	9	69,2	4	30,8	NS		
<b>A28</b>	8	100	0	0	NS		
<b>A29</b>	6	35,3	<b>11</b>	<b>64,7</b>	<b><math>P &lt; 0,02</math></b>	<b>4,9</b>	<b>1,6 – 14,9</b>
<b>A30</b>	8	80	2	20	NS		
<b>A31</b>	8	80	2	20	NS		
<b>A32</b>	3	50	3	50	NS		
<b>A33</b>	3	42,8	4	57,2	NS		

Els al·lells A23 i A24 s'han assignat com a A9. Els al·lells A25, A26, A34 i A66 s'han assignat tots com a A10. Els al·lells A68 i A69 s'han assignat com a A28. NS, no significatiu; OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

Taula 4.24. Freqüència dels al·lels TNFA1 i TNFA2 en individus tipats per a l'HLA-B (n = 94).

HLA-B	TNFA2-		TNFA2+		$P_{corr}$	OR*	95% IC*
	n	%	n	%			
<b>B5</b>	20	83,3	4	16,7	NS		
<b>B7</b>	11	84,6	2	15,4	NS		
<b>B8</b>	0	0	<b>13</b>	<b>100</b>	<b><math>P &lt; 0.0001</math></b>	<b>86.5</b>	<b>(8.6-∞)</b>
<b>B12</b>	16	47	18	53	NS		
<b>B13</b>	0	0	0	0	NS		
<b>B14</b>	11	73,3	4	26,7	NS		
<b>B15</b>	7	87,5	1	12,5	NS		
<b>B16</b>	3	100	0	0	NS		
<b>B17</b>	4	50	4	50	NS		
<b>B18</b>	11	91,6	1	8,4	NS		
<b>B21</b>	9	60	6	40	NS		
<b>B22</b>	2	100	0	0	NS		
<b>B27</b>	2	66,7	1	33,3	NS		
<b>B35</b>	6	75	2	25	NS		
<b>B37</b>	3	100	0	0	NS		
<b>B40</b>	4	57,1	3	42,9	NS		
<b>B41</b>	3	75	1	25	NS		
<b>B46</b>	0	0	1	100	NS		

Els al·lels B38 i B39 s'han assignat com a B16. Els al·lels B44 i B45 s'han assignat com a B12. Els al·lels B49 i B50 s'han assignat com a B21. Els al·lels B51, B52 i B53 s'han assignat com a B5. Els al·lels B54 i B55 s'han assignat com a B22. Els al·lels B57 i B58 s'han assignat com a B17. Els al·lels B60 i B61 s'han assignat com a B40. Els al·lels B62 i B63 s'han assignat com a B15. NS, no significatiu; OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

Els resultats obtinguts en la població d'estudi composta per dones amb parts a terme i pacients que van presentar RPM preterme o APP demostren que hi ha una forta associació de l'al·lel TNFA2 amb l'HLA B8 (test de Fisher:  $P_{corr} < 0,0001$ , taula 4.24). Aquests resultats coincideixen amb els trobats en la població general espanyola on també es va detectar l'associació entre el TNFA2 i l'al·lel B8 del HLA-B. Addicionalment es va detectar una associació entre el TNFA2 i l'HLA A29 ( $\chi^2 = 7,1$ ;  $P_{corr} < 0,02$ , taula 4.23) la qual també s'intuïa en la població general espanyola, on va ratllar la significació estadística.

A diferència de la població general, l'al·lel B21 no va presentar cap associació amb el TNFA2 en la població d'estudi (taula 4.24). Tampoc no es va trobar cap associació entre l'al·lel B14 i el TNFA1.

No s'ha trobat cap associació entre el TNFA2 i els al·lels de l'HLA de classe II, tot i que l'associació amb el DRB1\*03 va ser propera a la significació estadística ( $P_{corr} < 0,08$ , taula 4.25).

**Taula 4.25. Freqüència dels al·lels TNFA1 i TNFA2 en individus tipats per a l'HLA-DRB1 (n = 94).**

HLA-DRB1	TNFA2-		TNFA2+		P <sub>corr</sub>	OR*	95% IC*
	n	%	n	%			
<b>DRB1*01</b>	19	86,4	3	13,6	NS		
<b>DRB1*02</b>	18	81,8	4	18,2	NS		
<b>DRB1*03</b>	10	45,4	12	54,6	NS		
<b>DRB1*04</b>	13	54,2	11	45,8	NS		
<b>DRB1*05</b>	12	63,2	7	36,8	NS		
<b>DRB1*06</b>	16	84,2	3	15,8	NS		
<b>DRB1*07</b>	14	51,8	13	48,2	NS		
<b>DRB1*08</b>	5	100	0	0	NS		
<b>DRB1*09</b>	2	100	0	0	NS		
<b>DRB1*10</b>	4	66,7	2	33,3	NS		

Els al·lels DRB1\*11 i DRB1\*12 s'han assignat com a DRB1\*05. Els al·lels DRB1\*13 i DRB1\*14 s'han assignat com a DRB1\*06. Els al·lels DRB1\*15 i DRB1\*16 s'han assignat com a DRB1\*02. NS, no significatiu; OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

L'anàlisi dels haplotips va mostrar que l'al·lel TNFA2, igual que en la població general espanyola, està associat amb l'haplotip HLA A1, B8, DRB1\*03, ( $P < 0,003$ ) amb una OR de 26 (95% IC: 1,99 – ∞). L'al·lel TNFA2 també va presentar una associació amb els haplotips HLA B8, DRB1\*07 ( $P < 0,01$ , OR = 20,5, 95% IC: 1,4 – ∞), HLA A29, B21 ( $P < 0,01$ , OR = 19,7, 95% IC: 1,4 – ∞) i amb l'HLA A29, B12 ( $P < 0,007$ , OR = 6,6, 95% IC: 1,4 – 40,7).

#### 4.3.4.2. Anàlisi d'associació de l'HLA amb la ruptura prematura de membranes preterme

Amb la finalitat de testar la possibilitat que l'increment trobat en la susceptibilitat a patir RPM preterme en les portadores de l'al·lel TNFA2 pogués ser atribuït a una associació amb algun al·lel de l'HLA, es van comparar les freqüències dels al·lells de l'HLA que estaven en desequilibri de lligament amb l'al·lel TNF2 entre controls i pacients amb RPM preterme.

Tal com s'indica a la taula següent, els resultats van mostrar que els al·lells A1 i B8 estaven associats amb una major susceptibilitat a patir RPM preterme. A més a més, quan es va analitzar l'associació dels haplotips amb aquesta patologia es va observar una forta associació amb l'HLA A1, B8, DRB1\*03. Aquests resultats posen de manifest que l'associació entre l'al·lel TNFA2 i la RPM preterme pot ser deguda a un desequilibri de lligament d'aquest al·lel amb l'haplotip HLA A1, B8, DRB1\*03.

**Taula 4.26. Freqüències dels al·lells i haplotips de l'HLA associats amb l'al·lel TNFA2.**

	CONTROLS		RPM		P	OR*	95% IC*
	n	%	n	%			
<b>HLA-A1</b>	6	11,8	7	41,2	<b>P &lt; 0,01</b>	<b>5</b>	<b>1,1-23</b>
<b>HLA-A29</b>	11	21,6	1	5,8	NS		
<b>HLA-B8</b>	5	9,8	<b>6</b>	<b>35,3</b>	<b>P &lt; 0,02</b>	<b>5</b>	<b>1,03-24,4</b>
<b>HLA-B12</b>	18	35,3	5	29,4	NS		
<b>HLA-B21</b>	7	13,7	2	11,8	NS		
<b>HLA- DRB1*03</b>	12	23,5	6	35,3	NS		
<b>HLA- DRB1*07</b>	13	25,5	5	29,4	NS		
<b>HLA A29-B12</b>	7	13,7	1	5,8	NS		
<b>HLA A29-B21</b>	5	9,8	0	0	NS		
<b>HLA B8-DRB1*07</b>	2	4	1	5,8	NS		
<b>HLA A1-B8-DRB1*03</b>	1	2	<b>4</b>	<b>23,5</b>	<b>P &lt; 0,01</b>	<b>15</b>	<b>1,3-757</b>

OR\* Oportunitat relativa; 95% IC\*, interval de confiança del 95%.

# **Discussió**

Una qüestió que ha despertat molt interès en els darrers anys és el coneixement de la influència de les citocines en la interrelació maternofetal des de la implantació del zigot fins al moment del part. Actualment és ben conegut que determinades citocines tenen, per exemple, una funció reguladora del creixement i la diferenciació del trofoblast en la unitat maternofetal, a més a més de les funcions immunològiques clàssicament atribuïdes a cadascuna. La presència de TNF- $\alpha$  s'ha descrit en placenta, líquid amniòtic i cèl·lules deciduals. Les dades de nombrosos estudis suggereixen que el TNF- $\alpha$  inhibeix la proliferació de les cèl·lules amniòtiques, estimula la producció de prostaglandines, indueix apoptosi i estimula la producció d'enzims que degraden la matriu extracel·lular. Tanmateix, la presència de TNF- $\alpha$  a la unitat maternofetal és, en certa manera, sorprenent ja que el TNF- $\alpha$  produeix efectes que poden ser considerats perjudicials per al fetus. En aquest sentit, el TNF- $\alpha$  s'ha relacionat amb el part preterme i l'avortament en estudis amb animals. En humans, altes concentracions de TNF- $\alpha$  en líquid amniòtic s'han associat amb infeccions i desencadenament del part preterme.

El TNF- $\alpha$  exerceix les seves funcions a través de la interacció amb dos receptors (TNFR-p55 i TNFR-p75) que es troben en les cèl·lules diana. Cadascun d'aquests receptors existeix, a més a més, com a molècules solubles que s'originen pel clivatge dels receptors de membrana. Els receptors solubles s'uneixen al TNF- $\alpha$  competint amb els de membrana per la qual cosa poden funcionar com a inhibidors del TNF- $\alpha$ . Les concentracions plasmàtiques d'ambdós receptors solubles són normalment baixes, però s'ha demostrat que poden incrementar en diferents patologies.

Els nostres resultats mostren que en el grup de dones amb parts a terme controls, les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles p55 i p75 estan significativament augmentades en comparació amb el grup control de dones no embarassades. Aquests resultats coincideixen amb les dades publicades per R. Autsgulen i col·laboradors (1993). Els mateixos autors ja havien demostrat en un estudi anterior (1992b) que la concentració de receptors solubles en orina de dones embarassades és superior a la dels controls de dones no embarassades ja des de la setmana 21 de gestació. La presència de receptors solubles en l'embaràs normal no està restringida a l'organisme matern exclusivament, ja que en sang de cordó es detecten, igualment, concentracions elevades de receptors solubles. El conjunt d'aquests resultats, juntament amb el fet que en líquid amniòtic de

parts normals també s'evidencia la presència de receptors solubles, suggereix que el sistema TNF-TNFR té un paper en el desenvolupament fetal i en el desencadenament del part. A més a més això estaria recolzat per diferents estudis en els quals s'ha descrit la presència de TNF- $\alpha$  i de receptors solubles en líquid amniòtic ja des de l'inici de la gestació (Autsgulen R i col·l., 1992).

Els nostres resultats juntament amb el conjunt de dades publicades per altres autors portarien a la conclusió que l'embaràs normal en humans està associat amb una major alliberació dels receptors solubles del TNF- $\alpha$ . Per tant, l'embaràs és fins al moment l'únic estat fisiològic conegut que està associat amb un increment de les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles del TNF- $\alpha$ .

De les dades obtingudes que demostren la presència de receptors solubles en els diferents compartiments analitzats no es pot, però, extreure cap conclusió referent a si els receptors solubles són clivats a partir de l'organisme matern, del fetus o de la placenta, ja que els receptors podrien passar dels teixits placentaris a la circulació sanguínia materna o a la del fetus. Basant-se amb el fet que les concentracions de receptors solubles són majors en líquid amniòtic que en sang perifèrica materna o en sang de cordó, alguns autors han suggerit que la principal font d'aquests receptors està en la cavitat amniòtica (Autsgulen R i col·l., 1993; Maymon i col·l., 1999). Diferents estudis recolzen aquesta hipòtesi ja que han demostrat que la placenta, la decídua així com l'amni i el cori expressen els receptors TNFR-p55 i p75 (Autsgulen R i col·l., 1992; Steinborn A i col·l., 1998b). No obstant això, els resultats del nostre treball no corroborarien aquesta teoria ja que no s'ha trobat cap correlació entre les concentracions dels receptors solubles de compartiments diferents. Aquesta manca de correlació quan es comparen compartiments diferents, també la va observar R. Autsgulen i col·laboradors (1993). Existeixen, a més a més, altres estudis que també qüestionarien aquesta teoria. Així, en un treball publicat per A. Abbas i col·laboradors (1993) es descriu la presència de TNF- $\alpha$  en els fetus a partir de la setmana 21 de gestació. Posteriorment JN. Jarvis i col·laboradors (1995) van demostrar la presència d'mRNA de TNF- $\alpha$  i d'IL-1 $\beta$  en mostres de sang de mares i de fetus obtingudes per cordocentesi. Els nivells d'mRNA d'aquestes citocines en els fetus eren superiors als detectats en sang materna per la qual cosa van concloure que les citocines presents en sang fetal s'originen en el mateix fetus. La qüestió sobre l'origen dels receptors solubles que es troben en circulació perifèrica materna i en sang de cordó quedava, per tant, poc aclarida.



Per aquest motiu es va procedir a determinar l'expressió d'aquests receptors en cèl·lules de sang perifèrica materna i en sang de cordó. L'anàlisi de l'expressió dels receptors de citocines en sang de cordó també és important per establir quins receptors i en quina proporció s'expressen en els limfòcits de sang de cordó normal.

Tant els resultats obtinguts de la citometria de flux com els del Northern blot van indicar que les cèl·lules de sang perifèrica materna i de sang de cordó expressen constitutivament ambdós receptors i que, per tant, els receptors solubles plasmàtics podrien originar-se pel clivatge dels receptors de membrana que es troben en aquestes cèl·lules. En les cèl·lules de sang de cordó, però, l'expressió de l'mRNA dels receptors TNFR-p55 i p75 va ser en tots els casos inferior a la de les mares. Altres autors també han descrit resultats similars per a diferents citocines com el GM-CSF, G-CSF, INF- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , etc (Cairo i col·l., 1992; Weatherstone K i col·l., 1989). La menor expressió d'mRNA d'aquestes citocines en nounats podria ser secundària a un descens de l'activitat transcripcional dels gens corresponents o bé a alteracions posttranscripcionals. SM. Lee i col·laboradors (1993) van demostrar que el grau d'activació de la transcripció dels gens GM-CSF, G-CSF, IL-3 i M-CSF és igual en cèl·lules de sang de cordó i d'adult després d'una estimulació. Aquests resultats indicaven que els leucòcits de sang de cordó, durant els estats de major demanda (estimulació), transcriuen aquest gens amb els mateixos nivells que els adults. Aquestes dades també suggereixen que la menor expressió d'mRNA en leucòcits de cordó activats respecte als adults no és deguda a defectes en la regulació de la transcripció sinó que podria ser una conseqüència d'alteracions posttranscripcionals com una desregulació de l'estabilitat de l' mRNA. En aquest sentit s'ha descrit una disminució en la vida mitjana de l'mRNA del GM-CSF en cèl·lules de cordó activades en comparació amb les d'adult (Cairo M i col·l., 1991). És conegut que les seqüències riques en residus AU situades a la regió 3' no traduïda dels mRNA de nombroses citocines i protooncogens són seqüències de reconeixement de diferents proteïnes que actuen determinant l'estabilitat dels mRNA que la contenen. Els mRNA dels receptors TNFR-p55 i p75 no contenen aquestes seqüències AU, això no obstant, en el cas del receptor p55 s'ha descrit que una regió de 18 nucleòtids en la regió codificant del gen és la responsable del control de l'estabilitat de l'mRNA (Winzen R i col·l., 1996). Els mateixos autors també determinen que la disminució de l'estabilitat de l'mRNA per al TNFR-p55 és un important mecanisme de regulació de l'expressió d'aquest gen. És possible que alteracions en l'expressió i/o en l'activitat biològica d'alguna de les proteïnes que regulen l'estabilitat dels mRNA en les cèl·lules de

cordó pugui ser el mecanisme responsable de la disminució dels mRNA que codifiquen per als receptors TNFR-p55 i p75.

D'altra banda, es va observar que els receptors de membrana tenen, en la gestació, un comportament invers als receptors solubles. És a dir, en el part normal tant les cèl·lules limfocitàries maternes com les de sang de cordó van presentar un menor percentatge d'expressió d'ambdós receptors respecte al que van presentar les dones no embarassades. H. Zola i col·laboradors (1995) en un estudi on analitzen l'expressió dels receptors de diferents citocines (IL-4R, IL-2R, IL-6R, IL-7R, TNFR i el receptor de l'INF- $\gamma$ ), també observen una menor expressió d'aquests en cèl·lules limfocitàries de cordó en comparació amb els limfòcits de sang perifèrica d'adults. En canvi, els mateixos autors comproven que no hi ha diferències en el patró d'expressió dels receptors de citocines entre els monòcits de cordó i d'adult. En el nostre estudi també es va analitzar l'expressió dels receptors TNFR-p55 i p75 en monòcits de sang materna i de sang de cordó (dades no presentades en aquest treball). Tot i que no es poden extreure conclusions pel baix nombre de mostres que es van poder analitzar, a causa de la limitació en la seva quantitat, els resultats que vam obtenir concorden amb els publicats per H. Zola i col·laboradors. Per a aquests autors, l'expressió selectiva en determinats tipus cel·lulars de cordó de nivells de receptors comparables amb els dels adults, mentre que d'altres presenten una expressió més reduïda, suggereix que la regulació dels receptors de les citocines és molt complexa i que els diferents tipus cel·lulars regulen els seus receptors de forma diferent atenent, probablement, als requeriments funcionals de la maduració del sistema immunològic. En altres estudis s'ha suggerit que en molts casos la menor expressió de citocines i dels seus receptors en cèl·lules limfocitàries de cordó pot reflectir la manca d'exposició antigènica prèvia més que no pas una immaduresa (de les cèl·lules fetals) en el desenvolupament, ja que s'ha observat que les cèl·lules T d'adult antigènicament *naïve* són similars a les cèl·lules T neonatals en la seva menor capacitat per produir citocines en comparació amb les cèl·lules T efectores d'adult.

Tal com ja s'ha comentat, en el nostre estudi s'ha determinat l'expressió dels receptors de membrana del TNF- $\alpha$  en mostres de sang d'adults control, mostres de sang de mares i mostres de sang de cordó. L'anàlisi conjun d'aquests tres grups de població ens ha permès observar que en sang perifèrica materna l'expressió dels receptors de membrana és, igual que en sang de cordó, menor que en limfòcits perifèrics de dones no embarassades.

El paral·lelisme entre els resultats en sang materna i en sang de cordó, quant a l'expressió dels receptors TNFR-p55 i p75, ens porta a pensar que la menor expressió dels receptors en les cèl·lules limfocitàries de cordó, atribuïda a priori a una immaduresa seva, pugui ser, almenys en part, en realitat la conseqüència d'altres mecanismes de regulació immunològica que es donen durant la gestació en la unitat maternofetal.

En resum, el conjunt de resultats indiquen que l'embaràs normal està associat amb un major clivatge dels receptors de membrana que comporta un increment de la quantitat de receptors solubles en circulació i en el líquid amniòtic. Tal com s'ha comentat anteriorment, petites quantitats de TNF- $\alpha$  en l'espai maternofetal poden ser necessàries pel correcte desenvolupament fetal i per al desencadenament normal del part; un excés, però, pot causar efectes nocius per al fetus. Sembla, per tant, que durant l'embaràs l'activitat del TNF- $\alpha$  està molt regulada amb un increment dels receptors solubles cosa que conferiria una major capacitat de tamponar un excés en la producció d'aquesta citocina i mantindria la seva acció localitzada. Un altre punt de regulació es basaria en la disminució dels receptors de membrana de les cèl·lules limfocitàries de forma que aquestes serien menys sensibles a l'acció del TNF- $\alpha$ .

Són nombrosos els estudis publicats que demostren que en presència d'infecció de la cavitat amniòtica o de part preterme (independentment de si cursa amb infecció o sense) es produeix un increment de les concentracions de TNF- $\alpha$  en líquid amniòtic. D'altra banda, la informació disponible sobre les concentracions dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 és escassa. Cal destacar l'estudi publicat per E. Maymon i col·laboradors (1999) on es descriu un increment de les concentracions d'ambdós receptors solubles en líquid amniòtic de parts preterme. L'augment de les concentracions dels receptors solubles era superior en els casos que anaven acompanyats d'infecció de la cavitat amniòtica. Els nostres resultats concorden amb els presentats per aquests autors ja que en presència de signes d'infecció, i especialment en els casos de corioamnionitis, les concentracions dels receptors solubles s'incrementen en líquid amniòtic. Igualment, en el nostre estudi, els cinc casos de parts preterme analitzats, cap dels quals no va presentar signes d'infecció, també van mostrar nivells de receptors solubles augmentats en líquid amniòtic.

Quins són, doncs, els mecanismes responsables d'aquest increment en la concentració dels receptors solubles del TNF- $\alpha$ ? La regulació de les concentracions dels receptors solubles no es coneix bé. S'ha descrit que l'administració d'endotoxines o de

TNF- $\alpha$  induïx el clivatge dels receptors de membrana (Girardin E i col·l., 1992). En els parts amb signes d'infecció és probable, per tant, que els productes microbians i les citocines alliberades durant la resposta inflamatòria puguin ser els responsables de l'augment de les concentracions dels receptors solubles. S'ha suggerit que en alguns casos el part preterme que no presenta signes d'infecció pot reflectir una alteració en la regulació de la resposta immunològica materna a un determinat estímul bacterià. Aquest estímul pot ser relativament innocu en un hoste normal; això no obstant quan hi ha una regulació aberrant o inadequada del procés inflamatori, es produeix un excés de citocines proinflamatòries, mentre que les citocines antiinflamatòries, o bé no es produeixen o bé estan superades pel component proinflamatori. En aquest cas, l'agent bacterià pot no ser descobert o detectat en líquid amniòtic o en la flora vaginal. Alguns autors han donat al part preterme que pot ser causat per una infecció intrauterina no diagnosticada el terme de síndrome de la resposta inflamatòria intrauterina (Dudley DJ, 1999). L'augment de les concentracions dels receptors solubles en líquid amniòtic que hem detectat en els casos de parts preterme podrien també ser degudes a una activació del clivatge dels receptors de membrana causada per la major producció de citocines proinflamatòries i, en concret, de TNF- $\alpha$ .

Una dada addicional que cal destacar és que el grup de nounats amb risc d'infecció, malgrat que no van desenvolupar sèpsia, també van presentar una major concentració de receptors solubles en plasma respecte als nounats control. L'augment de les concentracions dels receptors solubles en aquesta població de risc podria ser un indicador de l'existència d'una resposta inflamatòria sistèmica en el fetus durant el període perinatal. En general, es considera que la resposta inflamatòria té un paper protector com es demostra pel fet que no tots els fetus o nounats afectats per un procés inflamatori sistèmic desenvoluparan un dany persistent. En canvi, una resposta inflamatòria molt important comportaria un major risc pel fetus de desenvolupar les diverses característiques biològiques de la sèpsia i també condicionar lesions tissulars permanents en diferents òrgans (lesions cerebrals de la substància blanca, displàsia broncopulmonar i leucomalàcia periventricular, entre altres). Per tant, és necessari investigar els mecanismes involucrats en la protecció del fetus enfront dels efectes potencialment deleteris d'una resposta inflamatòria incontrolada.

Durant el curs del part patològic (part amb signes d'infecció o part preterme) l'increment en la concentració de citocines proinflamatòries com el TNF- $\alpha$  podria servir com un senyal per desencadenar el part quan l'ambient intrauterí és nociu (per exemple en

els casos d'infecció o altres processos inflamatoris d'origen no infecciosos). Tanmateix, aquesta fita s'ha de dur a terme sense produir un dany permanent als teixits o al mateix fetus. En aquest sentit, el clivatge dels receptors solubles pot ser un mitjà per aconseguir aquest objectiu tamponant l'excés de TNF- $\alpha$ . D'aquesta manera hi hauria la quantitat suficient de TNF- $\alpha$  lliure que permetria induir el desencadenament del part, però seria insuficient per causar dany als teixits.

El segon objectiu d'aquest treball ha estat determinar les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  en nounats amb sèpsia neonatal precoç i en nounats controls durant les primeres 24 hores de vida per tal d'analitzar la implicació d'aquesta citocina en la fisiopatogènia de la sèpsia neonatal i la seva contribució al diagnòstic d'aquesta patologia. La sèpsia neonatal precoç encara és avui dia un problema important per als neonatòlegs a causa de la seva alta morbiditat i mortalitat. En la sèpsia neonatal la mortalitat és elevada i tant el seu diagnòstic precoç com el seu tractament són crítics per tal de millorar-ne l'evolució clínica. Tanmateix, els símptomes clínics inicials sovint són subtils i poc específics, la qual cosa en retarda el diagnòstic apropiat.

Els tests que habitualment s'utilitzen per establir un diagnòstic de sèpsia en nounats amb risc d'infecció són el recompte leucocitari amb fórmula diferencial i els nivells plasmàtics de proteïnes de fase aguda com la PCR, la fibronectina, l'haptoglobina, etc. Malauradament, les variacions d'aquests marcadors no acostumen a observar-se abans de 12 o 24 hores després de l'inici de la infecció neonatal i, per tant, la seva utilitat en el diagnòstic precoç és limitada (Mathers NJ and Pohlandt F, 1987). A més a més, aquests marcadors han mostrat una baixa sensibilitat i especificitat, la qual cosa posa de manifest la necessitat de trobar marcadors específics i precoços per al diagnòstic de la sèpsia neonatal.

L'activació de monòcits i macròfags és un dels primers events en la resposta inflamatòria contra la infecció. Les citocines produïdes per aquestes cèl·lules són les responsables de la cadena d'esdeveniments que donen lloc al xoc sèptic. El TNF- $\alpha$  és una de les citocines millor conegudes implicades en l'endotoxèmia humana i experimental (Tracey KJ i col·l., 1989; Matchinson JC i col·l., 1988; Michie HR i col·l., 1988; Calandra T i col·l., 1990). Tot això fa que aquesta citocina sigui un bon candidat per ser un marcador de la infecció neonatal.

Aquest i altres estudis han demostrat que hi ha un increment de les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  en nounats amb sèpsia (Roman J i col·l., 1993; Harris MC i col·l., 1994; Bont ESJM i col·l., 1994; Silveira RC and Procianoy RS, 1999; Özdemir A i col·l., 1994). A fi d'establir un llindar de normalitat de les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  es va calcular la sensibilitat, l'especificitat, el valor predictiu positiu i el valor predictiu negatiu per a diferents punts de tall, utilitzant per a aquests càlculs els valors dels controls i dels nounats amb sèpsia i xoc sèptic. El valor òptim del punt de tall de la concentració és aquell que ens permet detectar la majoria de veritables positius amb un baix nombre de resultats positius falsos. Alguns autors han proposat valors de punt de tall per al TNF- $\alpha$  que van de 12 a 70 pg/ml (Bont ESJM i col·l., 1994; Silveira RC and Procianoy RS, 1999; Ng PC i col·l., 1997). En la nostra opinió les variacions en els valors del punt de tall són principalment degudes als diferents mètodes que s'han utilitzat en la determinació de les concentracions de TNF- $\alpha$ . Utilitzant un mètode immunoradiomètric, nosaltres hem trobat el valor de punt de tall per al TNF- $\alpha$  de 30 pg/ml com un bon indicador d'infecció amb una sensibilitat i especificitat del 66% i del 96%, respectivament. Això no obstant, considerant la important mortalitat associada amb la infecció neonatal un bon marcador diagnòstic hauria de tenir una sensibilitat i un valor predictiu negatiu més alts, amb la finalitat d'assegurar la detecció de tots els nadons infectats, cosa que no era òptima utilitzant la determinació sola de TNF- $\alpha$ .

L'administració d'endotoxina en voluntaris humans o en animals d'experimentació indueix un increment de les concentracions de TNF- $\alpha$  en sèrum després de 2-3 hores i disminueix ràpidament als nivells basals. Addicionalment, el TNF- $\alpha$  es degrada ràpidament amb una vida mitjana estimada aproximadament de 6 minuts (Beutler B i col·l., 1985b). La dificultat per detectar el TNF- $\alpha$  pot explicar la baixa sensibilitat que hem trobat en el nostre estudi i també altres autors (Bont ESJM i col·l., 1994; Silveira RC and Procianoy RS, 1999; Ng PC i col·l., 1997).

Nosaltres vam hipotetitzar que la determinació simultània dels receptors solubles i del TNF- $\alpha$  podria obviar aquest problema; en primer lloc perquè els receptors solubles s'incrementen en les primeres fases de la infecció neonatal i, en segon lloc, perquè l'augment de les concentracions de receptors solubles persisteix durant més temps en plasma. A més a més, la determinació de les concentracions de receptors solubles podria tenir interès ja que la relació entre el TNF- $\alpha$  i els seus receptors solubles pot tenir conseqüències clíniques. De fet, quan es van combinar els valors del TNF- $\alpha$  i els dels

receptors sTNFR-p55 o sTNFR-p75, la sensibilitat i el valor predictiu negatiu van ser del 100%. Aquests valors asseguren que tots els nens veritablement infectats poden ser diagnosticats correctament i al mateix temps permet als clínics tenir la seguretat que el tractament amb antibiòtics en un nounat amb un resultat del test negatiu és innecessari. D'altra banda en aquest mateix test es va assolir una especificitat del 82%. Partint d'una màxima sensibilitat es pot acceptar una menor especificitat ja que els nounats amb un resultat del test positiu fals no moriran de sèpsia. Quin és, doncs, el mínim valor d'especificitat acceptable? Si bé no hi ha un consens, es pot assumir que un test amb una especificitat < 50% serà poc útil, ja que més del 50% dels nounats no infectats serien tractats innecessàriament amb antibiòtics. Per tant, el valor òptim del punt de tall per a un marcador d'infecció en nounats és el que manté la màxima sensibilitat amb una especificitat, com a mínim, de més del 50%.

D'altra banda, en el nostre estudi s'ha detectat un increment significatiu de les concentracions plasmàtiques d'ambdós receptors solubles en pacients amb sèpsia, en comparació amb el grup control de nadons sense infecció. Aquests resultats indiquen que els receptors solubles tenen una funció protectora, ja que atenuen els efectes nocius de l'excessiva activitat del TNF- $\alpha$  durant la sèpsia. Tanmateix, quan es van analitzar les concentracions dels receptors solubles en termes d'excés molar, es va detectar un marcat descens en els pacients amb xoc sèptic en comparació amb els controls o amb els pacients amb sèpsia. El descens de l'excés molar en nounats amb xoc sèptic pot ser un indicador del fracàs dels mecanismes que controlen la resposta inflamatòria induïda pel TNF- $\alpha$ , la qual cosa dona lloc a un xoc refractari. En altres paraules, la major alliberació de sTNFR sembla ser inadequada per neutralitzar la citotoxicitat deguda a l'excessiva producció de TNF- $\alpha$  durant el xoc sèptic. Aquesta idea estaria d'acord amb les dades publicades per Van Zee i col·laboradors (1992), els quals demostren la necessitat d'un excés molar superior a 300 vegades el receptor soluble sTNFR-p55 per inhibir el 80% de la citotoxicitat causada per una dosi d'1,5 ng/ml de TNF- $\alpha$ .

La correlació que hem trobat entre el TNF- $\alpha$  i els seus receptors solubles recolzaria l'existència d'un mecanisme de control del clivatge i/o de la síntesi dels receptors del TNF- $\alpha$  per tal d'assegurar, probablement, el tamponament apropiat del TNF- $\alpha$ . Girardin i col·laboradors (1992) van descriure l'existència de dos tipus de correlacions entre el TNF- $\alpha$  i els seus receptors solubles en pacients amb meningococcèmia. Igual que nosaltres,

aquests autors van observar una correlació lineal entre concentracions baixes de TNF- $\alpha$  i les concentracions sèriques dels receptors solubles. No obstant això, quan les concentracions de TNF- $\alpha$  excedeixen un valor de 500 pg/ml, les concentracions d'ambdós receptors solubles no incrementen proporcionalment en la fase inicial de la malaltia, i els autors suggereixen que el desequilibri resultant pot ser de gran importància en la fisiopatologia del xoc. Efectivament, en la nostra població d'estudi, tots els nadons amb concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  inferiors a 100 pg/ml van sobreviure, mentre que concentracions plasmàtiques superiors a 100 pg/ml en les primeres 24 hores de vida van correlacionar amb un mal pronòstic, sent la mortalitat del 50%.

En població adulta s'ha investigat extensament en la cerca de marcadors útils per a la monitorització de l'evolució clínica en la sèpsia (Van der Poll T i col·l., 1993; Calvano SE i col·l., 1996). En un estudi fet per Ertel i col·laboradors (1994) es va demostrar que les concentracions plasmàtiques elevades de forma persistent dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 es correlacionaven amb un pitjor pronòstic en pacients amb sèpsia. En el nostre estudi, s'han mesurat per primera vegada les concentracions seriades dels receptors solubles del TNF- $\alpha$  en plasma de nounats. Tal com ja s'ha comentat, els resultats mostren que les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles estan significativament augmentades en nounats amb sèpsia i xoc sèptic respecte dels controls en les primeres 24 hores de vida. L'avaluació longitudinal en un grup de pacients amb sèpsia ha mostrat que la progressiva normalització de les concentracions dels receptors solubles, principalment del receptor sTNFR-p75, es correlaciona amb un curs clínic favorable dels pacients. Tanmateix, a causa de l'escàs nombre de casos analitzats, principalment per la limitació en la quantitat de sang que es pot obtenir dels neonats, seria necessària la inclusió de més pacients per obtenir conclusions definitives al voltant d'aquests resultats. A més a més, la incorporació de les determinacions seriades de les concentracions de TNF- $\alpha$  permetria tenir un millor coneixement de la cinètica del TNF- $\alpha$  i dels receptors solubles plasmàtics en nounats amb sèpsia.

En conclusió els inhibidors naturals del TNF- $\alpha$  poden tenir una funció important com a moduladors de l'activitat biològica del TNF- $\alpha$ . A partir dels nostres resultats s'observa que quan les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  excedeixen un determinat llindar (100 pg/ml), es perd la linealitat entre les concentracions de TNF- $\alpha$  i les dels seus receptors solubles. La progressió cap al xoc refractari és, almenys en part, una



conseqüència resultant del desequilibri entre el lligand i els seus inhibidors. Les dades que hem obtingut indiquen l'existència d'una implicació precoç del sistema TNF/sTNFR en la infecció neonatal, la qual cosa afavoreix la hipòtesi que els receptors solubles recombinants del TNF- $\alpha$  o els anticossos anti-TNF- $\alpha$  poden ser útils en el tractament de la sèpsia neonatal. Tanmateix, els assaigs clínics en adults amb sèpsia han donat resultats contradictoris. Mentre que el tractament amb el receptor soluble sTNFR-p55 ha mostrat ser protector (Abraham E i col·l., 1997), el tractament amb el receptor soluble sTNFR-p75 i amb els anticossos monoclonals anti-TNF- $\alpha$  incrementen la mortalitat (Fisher CJ i col·l., 1996; Abraham E i col·l., 1995). Aquesta major mortalitat associada a la teràpia amb anticossos monoclonals anti-TNF- $\alpha$  s'ha atribuït al bloqueig total de l'activitat del TNF- $\alpha$ , cosa que interferiria amb els efectes protectors que proporcionen baixes concentracions de TNF- $\alpha$  durant una infecció. També s'ha observat un increment en la mortalitat i en la simptomatologia de la resposta sistèmica inflamatòria després del tractament amb sTNFR-p75. Aquest fenomen s'ha atribuït a les propietats cinètiques del complex TNF- $\alpha$ /sTNFR-p75, el qual permetria la generació d'un reservori de TNF- $\alpha$  que prolongaria l'activitat biològica d'aquesta citocina, i d'aquesta manera se'n potenciarien els efectes deleteris. D'altra banda, els guanys obtinguts utilitzant inhibidors del TNF- $\alpha$  en malalties com ara l'artritis reumatoide o la malaltia de Crohn encoratgen a considerar aquest plantejament terapèutic en el tractament de la sèpsia neonatal.

Malgrat els progressius avenços tècnics dels darrers anys, el percentatge de parts prematurs, associats o no a RPM, no ha disminuït de forma significativa. Existeixen nombroses evidències que ens permeten postular l'existència d'una predisposició genètica per al part prematur. En primer lloc, un dels principals factors de risc per al part preterme és haver tingut un part anterior prematur. A més, el risc s'incrementa si el nombre de parts preterme anteriors són dos o més. En segon lloc, està ben descrit que hi ha diferències racials associades a un major risc de part prematur, per exemple, les dones de raça negra tenen el doble de risc de tenir parts prematurs en comparació amb dones de raça blanca (Wang X i col·l., 1995). Finalment, hi ha diferents malalties genètiques, com la distròfia miotònica o la malaltia de d'Ehlers-Danlos que estan freqüentment associades a parts preterme.

Actualment, les tècniques moleculars de què disposem ens donen l'oportunitat d'investigar gens candidats que podrien ser responsables del part prematur. Amb tot, hi ha

pocs estudis publicats que analitzin les influències genètiques responsables d'aquesta patologia. En aquest sentit, l'últim dels objectius del treball que presentem pretén analitzar l'associació amb el part preterme d'una variant polimòrfica del gen candidat TNF- $\alpha$ . La finalitat, per tant, és obtenir marcadors genètics que ens permetin definir grups de risc pel que fa al desenvolupament de parts preterme o RPM preterme. Aquests coneixements ens permetrien identificar els pacients amb risc i alhora ens poden ajudar a desenvolupar programes de prevenció i millors règims terapèutics.

El gen del TNF- $\alpha$  mapa a la regió de classe III del MHC, aproximadament a 250 kb centromèric del locus HLA-B i 850 kb telomèric de l'HLA-DR. A partir dels efectes biològics anteriorment comentats d'aquesta citocina i la seva localització gènica, s'ha especulat que els polimorfismes situats en aquest locus podrien contribuir a les associacions conegudes de l'MHC amb malalties autoimmunes o infeccioses, particularment aquelles en les quals el TNF- $\alpha$  està implicat en la iniciació o el manteniment de la resposta inflamatòria com ara l'artritis reumatoide o en els casos on l'increment plasmàtic del TNF- $\alpha$  es relaciona amb un pitjor pronòstic, com per exemple la malària. Tot això està recolzat per les diferents associacions descrites d'haplotips específics de l'MHC amb diferents fenotips del TNF- $\alpha$ : individus amb els haplotips DRB1\*03 i DRB1\*04 produeixen alts nivells de TNF- $\alpha$ , mentre que els haplotips DRB1\*02 estan associats a una baixa producció, la qual cosa suggereix l'existència d'algun polimorfisme funcional en les regions reguladores del gen del TNF- $\alpha$ .

D'altra banda, existeixen diferents trets que dificulten la determinació de si una variant d'DNA concreta de l'MHC és directament la responsable de l'associació amb una malaltia. Per exemple, aquesta és la regió més polimòrfica del genoma i conté diversos gens que codifiquen per a proteïnes que participen en la resposta immunològica i inflamatòria. Una altra característica important és el fort desequilibri de lligament que hi ha entre els al·lels de l'MHC. Per tant, els fenotips del TNF- $\alpha$  poden no ser deguts a polimorfismes en el mateix gen del TNF- $\alpha$ , sinó a variacions en un gen lligat que reguli l'expressió d'aquesta citocina per les associacions que hi ha amb els haplotips del MHC. En conseqüència, és important demostrar un efecte funcional directe per a cada polimorfisme, ja que l'associació amb una malaltia pot ser completament causada per un desequilibri de lligament amb el veritable gen etiològic. És per aquest motiu que qualsevulla anàlisi d'associació entre variants genètiques d'aquesta regió i una determinada

patologia hauria d'incloure el tipatge de l'HLA dels pacients per demostrar que veritablement l'associació correspon a la variant analitzada i no a un altre locus amb desequilibri de lligament.

El polimorfisme que hem analitzat mapa en una regió del gen del TNF- $\alpha$  important en la regulació de la seva transcripció. Tanmateix, la rellevància d'aquest polimorfisme *in vivo* és encara un motiu de controvèrsia. Diferents autors han demostrat que l'al·lel TNFA2 és un activador transcripcional més potent que l'al·lel TNFA1, tot i que els mecanismes moleculars d'aquesta diferència no estan completament aclarits ja que no s'han trobat evidències de diferències en l'afinitat de proteïnes d'unió al DNA amb les dues formes al·lèliques del promotor del gen del TNF- $\alpha$  (Braun N i col·l., 1996; Kroeger KM i col·l., 1997; Wilson AG i col·l., 1997; Wu WS i McClain KL, 1997). Tanmateix, altres estudis no han trobat cap efecte de la substitució G/A -308 pb en la producció de TNF- $\alpha$  (Pociot F i col·l., 1993; Stuber F i col·l., 1995; Uglialoro AM i col·l., 1998). En suport de la importància de l'al·lel TNFA2 els estudis d'estimulació cel·lular han mostrat que l'al·lel TNFA2 està associat a una major producció de TNF- $\alpha$  *in vitro* (Bouma G i col·l., 1996; Louis E i col·l., 1998). A més a més, l'al·lel TNFA2 s'ha associat també amb un major risc de malària cerebral (McGuire W i col·l., 1994), leishmaniosi mucocutània (Cabrera M i col·l., 1995) i més recentment amb diverses alteracions com l'asma (Moffatt MF and Cookson WO, 1997), la leucèmia limfocítica crònica (Demeter J i col·l., 1997) i fins i tot amb l'obesitat (Herrmann SM i col·l., 1998) entre altres.

En aquest estudi hem descrit per primera vegada les freqüències al·lèliques del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  en població espanyola i s'han comparat amb les freqüències descrites en altres grups. Quan es comparen les freqüències al·lèliques del polimorfisme -308 pb de la nostra població amb altres poblacions caucàsiques o africanes no es troben diferències significatives. Això no obstant, quan les freqüències es comparen amb població oriental la distribució de l'al·lel varia, principalment, per la disminució en la freqüència de l'al·lel TNFA2. La baixa freqüència de l'al·lel en els orientals pot ser deguda al fet que aquest al·lel hagi estat seleccionat negativament per la major secreció de TNF- $\alpha$  associada. Alternativament, podria estar relacionat amb la baixa freqüència de l'haplotip de l'HLA A1-B8-DRB1\*03 en població oriental (A1: 0.7%, B8: 0% i DRB1\*03: 0.2%) (Imanishi T i col·l., 1991). L'al·lel TNFA2 està en desequilibri de lligament amb aquest haplotip en caucàsics (Wilson AG i col·l., 1993).

S'ha hipotetitzat que els polimorfismes que es troben en les regions promotores poden conferir flexibilitat a la resposta immunològica la qual cosa permet una producció diferencial de citocines. La presència de certs al·lels pot influir en l'evolució d'algunes malalties i per tant, poden haver estat seleccionats en poblacions específiques. Addicionalment, si es demostrés que els polimorfismes dels gens de les citocines influïssin en la resposta immune enfront de diferents situacions, llavors les diferències de les freqüències entre grups de poblacions, tal com s'ha descrit en aquest estudi, podrien tenir una rellevància clínica. Un exemple podria ser el trasplantament, on s'ha analitzat la influència dels polimorfismes en els gens de diferents citocines. Així, per exemple, s'ha observat que el polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  no té un efecte substancial en el rebuig del trasplantament de cor (Turner DM i col·l., 1995); no obstant això s'ha observat un major risc de rebuig en els receptors del trasplantament que són portadors de l'al·lel TNFA2 en combinació amb l'al·lel -1082A del gen de l'IL-10 en homozigosi (Turner DM i col·l., 1997). En el trasplantament renal, la combinació de manca de l'al·lel -1082A i ser portador del TNFA2 dona un major risc per múltiples episodis de rebuig quan donant i receptor difereixen en l'HLA-DR (Sankaran P i col·l., 1999).

Tal com ja s'ha comentat, en un estudi amb població de l'Europa del nord Wilson i col·laboradors (1993) troben una forta associació de l'al·lel TNFA2 amb l'haplotip HLA A1-B8-DRB1\*03 (HA 8.1). Igualment, els resultats presentats en aquest treball confirmen que, en població espanyola, l'al·lel TNFA2 també presenta un fort desequilibri de lligament amb aquest haplotip. Segons l'associació que presenta l'al·lel TNFA2 amb l'HA 8.1 és interessant especular que el polimorfisme del TNF- $\alpha$  pot contribuir de forma causal en algunes de les malalties associades amb l'haplotip 8.1. Tanmateix, no queda clar si aquestes associacions són degudes al producte d'aquests al·lels directament o a gens que es troben en desequilibri de lligament amb ells.

L'associació que hem trobat en població espanyola entre l'al·lel TNFA2 i el DRB1\*03 explicaria l'associació coneguda des de fa uns quants anys entre el fenotip d'alta producció de TNF- $\alpha$  i l'haplotip DRB1\*03. D'altra banda, en el nostre estudi no s'ha trobat cap associació entre els dos al·lels del TNF i els haplotips DRB1\*04 i DRB1\*02 i, per tant, les associacions descrites entre DRB1\*04 i DRB1\*02 amb alta i baixa producció de TNF, respectivament, no es poden explicar a partir dels nostres resultats. Contradictòriament, AG. Wilson i col·laboradors (1993) en un estudi amb població del

nord d'Europa descriuen una associació entre l'al·lel TNFA1 i l'haplotip DRB1\*04. Per tant, sembla raonable especular que altres polimorfismes, que hi poden haver en altres zones reguladores del gen del TNF- $\alpha$  o en gens lligats, tindrien també una funció reguladora del TNF- $\alpha$ . Seria possible que aquestes variants polimòrfiques estiguin en desequilibri de lligament amb els haplotips DRB1\*04 i DRB1\*02.

Una observació interessant és que els malalts amb malària cerebral tenen una major concentració plasmàtica de TNF- $\alpha$  que els pacients amb malària. En un estudi amb població de Gàmbia s'ha demostrat que l'homozigotat per a l'al·lel TNFA2 està associada amb un major risc (4 vegades) de patir malària cerebral i amb un increment de 7,7 vegades en el risc de mort o de patir complicacions neurològiques severes (McGuire W i col·l., 1994). Malgrat els efectes adversos de l'homozigotat en la malària, l'al·lel TNFA2 es manté en una freqüència similar a les de poblacions com les de l'est d'Àfrica, la d'Europa del nord o la turca. El manteniment d'aquest polimorfisme en el promotor del TNF- $\alpha$  en àrees on la malària és endèmica suggereix que la producció d'uns nivells basals relativament alts de TNF- $\alpha$  en els heterozigots seria beneficiosa per a l'hoste en la seva lluita contra la malària. Tanmateix, això també podria reflectir l'existència de pressions compensatòries a l'Àfrica per mantenir aquest al·lel, per exemple, podria tenir efectes beneficiosos en altres malalties importants com el xarampió, la malaltia meningocòccica, la lepra o la tuberculosi. També és possible que els homozigots presentin avantatges selectius enfront d'altres malalties diferents de la malària.

Tal com ja s'ha comentat amb anterioritat, el polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  s'ha associat amb uns nivells constitutius i induïbles majors de transcripció d'aquest gen. La nostra hipòtesi és que a partir de l'associació descrita de concentracions més elevades de TNF- $\alpha$  amb el part preterme, les dones amb parts prematurs tindran una freqüència més alta de l'al·lel TNFA2. Els resultats obtinguts en l'estudi de l'associació del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  amb el part preterme assenyalen que l'al·lel TNFA2 està representat en una freqüència més alta en la població de dones amb ruptura prematura de membranes preterme, i això demostra que hi ha una susceptibilitat genètica a aquesta patologia.

Cal destacar que aquesta associació només es va trobar en el grup de pacients que no van presentar signes d'infecció en l'ingrés o en el moment del part. A més a més, el

grup de pacients amb signes d'infecció va mostrar una disminució en la freqüència de portadors de l'al·lel TNFA2 que va ser estadísticament significativa quan es va comparar amb el grup de pacients sense signes d'infecció.

Aquests resultats demostren que en presència de signes d'infecció no es detecta cap associació entre l'al·lel TNFA2 i un major risc a patir RPM preterme o APP. Això posa de manifest que aquest no és un grup adequat per analitzar la contribució del polimorfisme del TNF- $\alpha$  a la RPM preterme o a l'APP. Possiblement, quan es produeix una infecció important el grau d'estimulació i producció de TNF- $\alpha$  en ambdós al·lells és ja tan elevada que no permetria distingir l'efecte que pot determinar el polimorfisme en l'expressió d'aquest gen. En canvi, tal com s'ha comentat anteriorment, en el grup de pacients que no presentaven signes d'infecció sí que es va demostrar l'existència d'una associació entre l'al·lel TNFA2 i una major predisposició a patir RPM preterme. Aquests resultats estarien d'acord amb la nostra hipòtesi que davant un estímul infeccios mínim les portadores de l'al·lel TNFA2 produirien una resposta inflamatòria augmentada que alhora comportaria un major risc de desenvolupar RPM preterme. D'altra banda, el fet que el grup de pacients amb signes d'infecció presenti una menor proporció de portadores de l'al·lel rar del TNF- $\alpha$  suggereix que, dins del grup de pacients amb RPM preterme o APP, l'al·lel TNFA2 estaria associat amb un menor risc a desenvolupar malalties infeccioses. Aquests resultats es podrien explicar com que l'increment en la producció de TNF- $\alpha$ , en els portadors de l'al·lel TNFA2, estaria relacionat amb una resposta inflamatòria augmentada capaç, bé de combatre els agents patògens de forma més eficient, bé de desencadenar el part abans que la infecció pugui progressar suficientment per produir signes clínics, i això igualment recolza de forma indirecta la nostra hipòtesi inicial. Finalment, cal destacar que d'aquests resultats no es pot concloure que l'al·lel TNFA2 tingui un paper protector enfront de les infeccions. Per fer-ho caldria haver fet un disseny de la població d'estudi diferent, si bé això seria motiu d'un altre estudi.

D'altra banda, no s'ha trobat cap associació entre l'al·lel TNFA2 i una major susceptibilitat a l'APP. L'anàlisi estratificada d'aquest grup de pacients tampoc no va mostrar cap associació de l'al·lel ni amb el subgrup de dones que no van respondre al tractament i que, per tant, van presentar un part prematur idiopàtic, ni amb aquelles on els tocolítics van aconseguir diferir el part a terme. Tant el part preterme idiopàtic com l'RPM preterme comparteixen el mateix conjunt de factors etiològics i ambdues patologies es

caracteritzen per una activació de la cascada de citocines, la qual indueix la producció de prostaglandines que promouran la contractibilitat uterina. Malgrat aquestes similituds, recentment s'ha evidenciat que ambdues patologies presenten vies moleculars divergents. Així, l'RPM es caracteritza per un increment de l'expressió de metal·loproteïnases de matriu extracel·lular, un descens dels seus inhibidors i una activació de les vies d'apoptosi mitjançades per p53/bax i pel TNF/Fas en les membranes fetals. En el part preterme aquests processos no estan presents i predominen l'expressió de gens antiapoptòtics com el Bcl-2 (Fortunato SJ and Menon R, 2001a). Els desencadenants de cadascuna de les vies no es coneixen ni tampoc els factors que determinen que una pacient expressi risc a RPM, i una altra, a part preterme. Per tant, és difícil explicar per què l'associació del polimorfisme del TNF- $\alpha$  que hem analitzat es presenta només en l'RPM i no en el part preterme. Una possible explicació seria l'existència dels dos receptors del TNF- $\alpha$  amb capacitat d'activar vies de senyalització diferents i que, a més, presenten diferent afinitat pel TNF- $\alpha$ . Així, l'activació del receptor TNFR-p55 requereix de nivells més alts de TNF- $\alpha$ , els quals vindrien determinats per la presència de l'al·lel TNFA2. La unió del TNF- $\alpha$  amb el receptor TNFR-p55 activa vies de senyalització que condueixen a l'apoptosi cel·lular. En canvi, a baixes concentracions el TNF- $\alpha$  s'uneix preferentment amb el receptor d'alta afinitat TNFR-p75. L'activació d'aquest receptor inicia una via de transducció de senyal a través de TRAF que condueix a l'activació del NF $\kappa$ B i que dona lloc a una resposta més citotòxica i proinflamatòria en comparació amb la resposta apoptòtica iniciada pel TNF- $\alpha$ /TNFR-p55. Es pot especular que en el part preterme pot existir aquesta via inflamatòria més que l'apoptòtica.

Si bé els nostres resultats demostren una associació entre l'RPM preterme i l'al·lel TNFA2, aquesta associació, però, no és independent de l'HLA-A1, B8 I DRB1\*03. A partir del desequilibri de lligament present entre l'al·lel TNFA2 i l'haplotip HA 8.1 no podem afirmar, però tampoc descartar, que el polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  tingui un efecte directe en l'RPM preterme. Igualment, en altres estudis amb població caucàsica i oriental, l'al·lel TNFA2 també s'ha trobat associat amb susceptibilitat a l'enteropatia sensible al gluten, a lupus sistèmic eritematós, a dermatitis herpetiforme i altres malalties associades amb l'haplotip HA 8.1. Això no obstant, cada estudi ha conclòs que aquestes associacions poden ser explicades pel desequilibri de lligament amb l'haplotip HA 8.1 (Wilson AG i col·l., 1995; McManus R i col·l. 1996; Chen C i col·l., 1997). En canvi, en població

africana, l'al·lel TNFA2 es troba en individus que no són portadors d'elements de l'HA 8.1 i es correlaciona, tal com ja s'ha comentat, amb susceptibilitat a la malària cerebral la qual cosa suggereix una funció directa per a aquest polimorfisme. Si bé aquestes dades indiquen que el polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  pot ser actiu in vivo, no en constitueixen una prova definitiva ja que es coneix molt poc sobre els efectes d'altres haplotips africans.

Dizon-Townson i col·laboradors (1997) no van poder demostrar una diferència en la freqüència de l'al·lel TNFA2 entre un grup de dones amb parts preterme i el grup control de dones amb part a terme. Aquests autors, però, no van diferenciar els casos de prematuritat idiopàtica d'aquells que van presentar RPM preterme, no van descartar aquelles dones amb història prèvia de parts prematurs o RPM en el grup control, ni tampoc van analitzar les dades atenent els diferents grups ètnics que componien la població d'estudi. En canvi, Roberts i col·laboradors (1999) van observar una associació entre l'al·lel TNFA2 i un major risc per RPM preterme en població afroamericana, igual que els nostres resultats en població caucàsica. Cal remarcar que en aquest estudi no es va analitzar si aquesta associació era independent d'un desequilibri de lligament amb algun haplotip de l'HLA.

L'haplotip ancestral (HA) 8.1 (*HLA-A1, CW7, B8, Bfs, C4AQ0, C4B1, DR3, DQ2*) és un haplotip caucàsic comú del qual són portadors la majoria d'individus amb l'HLA-B8. S'anomenen haplotips ancestrals aquells que defineixen haplotips altament conservats que semblen derivar d'un ancestre comú. S'ha demostrat que el 88% dels caucàsics australians que són portadors de l'al·lel B8 tenen tots els altres al·lells de l'HA 8.1 entre l'HLA-B i el DR; en canvi, el grau de conservació és menor (57%) en població italiana (Degli-Esposti i col·l., 1992a; D'Alfonso S i col·l., 1994). En el nostre estudi no es van tipificar tots els al·lells de l'HLA i, per tant no podem saber quin és el grau de conservació de l'HA 8.1 en la població analitzada. Això no obstant, en 25 individus on es van determinar, a més a més, els al·lells CW i DQ, tots els portadors de l'al·lel B8 tenien els al·lells CW7, DR3 i DQ2, característics de l'HA 8.1. Tot i que no es poden extreure conclusions d'aquests resultats pel baix nombre d'individus tipificats, aquests resultats suggereixen que en població espanyola el grau de conservació de l'HA 8.1 també podria ser alt.

Aquest haplotip és únic quant a la seva associació amb un ampli rang de malalties. S'ha associat amb una pèrdua accelerada de cèl·lules T CD4+ i pitjor supervivència després d'una infecció per VIH (Cameron PU i col·l., 1992). També predisposa els portadors a



la diabetis insulíndependent, a la malaltia celíaca o enteropatia sensible al gluten, al lupus sistèmic eritematós, a la dermatitis herpetiforme, a la deficiència d'IgA, a la miastèmia gravis, a l'escleroderma i a la malaltia periodontal en pacients amb SIDA (Hanifi Moghaddam i col·l., 1998; Wilson AG i col·l., 1995; Christiansen FT i col·l., 1991). A més a més, alguns al·lels present, en l'HA 8.1 estan en una freqüència major en pacients amb sarcoïdosi, cirrosi alcohòlica, crioglobulinèmia associada a hepatitis C i malaltia d'Addison (Olenchock SA i col·l., 1981; Lenzi M i col·l., 1998). No obstant això, aquest haplotip és molt freqüent en caucàsics. De fet, malgrat els efectes deleteris, aproximadament 10 milions d'europaus són portadors de l'HA 8.1. Això suggereix que aquest haplotip ha de conferir alguna compensació en la selecció. S'ha hipotetitzat que els avantpassats dels europeus van colonitzar i habitar ambients que diferien molt dels que es trobaven a l'Àfrica, on van aparèixer els primers homínids. Aquest canvi d'hàbitat va poder anar acompanyat per una major selecció imposada per un clima més dur que comportaria, per exemple, una pressió per patògens diferents, entre altres factors de selecció (Parham P, 1999).

D'altra banda, hi ha pocs estudis adreçats a perfilar els mecanismes immunològics subjacents a les associacions entre l'HA 8.1 i les diferents malalties immunopatològiques. De forma general, l'haplotip sembla afectar l'activació cel·lular com a conseqüència d'una alteració en el balanç de citocines que es produeixen. Un dels trets més característics de l'HA 8.1 és l'increment en la producció basal de TNF- $\alpha$  (Lio D i col·l., 2001). A més a més, diferents resultats indiquen que els portadors d'aquest haplotip tenen una menor producció d'IL-5, d'IL-2 i d'IFN- $\gamma$ , mentre que la producció d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10 i d'IL-13 no està alterada (Caruso C i col·l., 1996). També s'ha observat un increment en l'apoptosi espontània dels limfòcits perifèrics en individus portadors de l'HLA-B8-DR3. L'increment de l'apoptosi s'ha relacionat amb un major percentatge de cèl·lules CD95, cosa que concorda amb els nivells baixos de limfòcits circulants que s'han descrit en portadors de l'HA 8.1 (Caruso C, 1997). Tots aquests canvis podrien ser deguts, almenys en part, a l'alta producció de TNF- $\alpha$  que està associada amb aquest haplotip. De fet, una alta producció de TNF- $\alpha$  pot donar lloc a una predominància de la resposta immunològica de tipus Th2 com a conseqüència de l'increment en la mort per apoptosi de les cèl·lules Th1 relacionada amb l'increment en l'expressió de CD95 i amb una major producció de cortisol estimulada pel TNF- $\alpha$  (Candore G i col·l., 1998). La inducció de la producció de cortisol i de citocines Th2 pel TNF- $\alpha$  té un efecte sinèrgic en l'increment de l'apoptosi que comporta un desequilibri de la població de cèl·lules T circulants.

Tal com s'ha comentat anteriorment, en el grup de pacients amb RPM hi ha un desequilibri de lligament entre l'al·lel TNFA2 i l'haplotip HA 8.1, per la qual cosa no podem confirmar que el polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  tingui un efecte directe en l'RPM. En aquest cas podríem pensar que un altre gen o variant en desequilibri de lligament podria ser el veritable gen etiològic responsable de l'RPM preterme. A causa de l'alt nombre de gens que mapen en aquesta zona i que potencialment poden modular la resposta immunològica, una altra alternativa seria que diferents gens de l'haplotip HA 8.1 podrien conjuntament afectar l'ambient immunològic que determina la susceptibilitat a l'RPM preterme. Alguns d'aquests gens candidats es discuteixen a continuació.

L'anàlisi de l'oportunitat relativa dels al·lells de l'HLA associats a l'RPM preterme suggereix que la regió crítica de l'HA 8.1 que conferiria susceptibilitat a aquesta patologia se situaria probablement en la regió de l'HLA de classe I i de classe III. Les molècules de l'HLA presenten fragments de pèptids processats a les cèl·lules T i en conseqüència poden restringir i regular la resposta d'aquestes cèl·lules contra antígens específics. L'HLA de l'hoste determina en gran mesura el tipus de resposta immunològica que s'originarà després d'una infecció. Els al·lells de l'HLA de classe I A1 i B8 podrien actuar presentant de forma preferent determinats antígens, tanmateix la gran varietat de patògens associats a l'RPM fa que s'hagi de descartar un mecanisme antigenoespecífic. Un altre argument en contra d'un paper rellevant dels al·lells A1 i B8 en la fisiopatogènia de l'RPM és que durant la gestació el sistema immunològic innat de la mare està activat mentre que la immunitat adaptativa està relativament inhibida.

La regió central o classe III de l'MHC s'expandeix sobre unes 700 Kb, conté més de 60 gens, i constitueix una de les regions més denses en gens dins del genoma humà. En aquesta regió es troba el clúster del TNF on, a més a més del polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$ , s'han descrit altres variants, una de les quals, el polimorfisme de fragments de restricció (RFLP) NcoI defineix un al·lel (TNFB\*2) associat amb l'HA 8.1, si bé no s'ha pogut demostrar una correlació entre aquest al·lel i variacions en la producció de TNF (Abraham LJ, 1991). Addicionalment, hi ha tres polimorfismes de microsatèl·lit (TNFa, TNFb i TNFc) situats a prop del gen del TNF- $\beta$ . S'ha demostrat que els al·lells TNFa2, b3 i c1 estan relacionats amb una major producció de TNF- $\alpha$  i, a més, estan associats amb l'HA 8.1 (Dawkins R i col·l., 1999).

En aquesta regió també existeixen, diferents gens que participen en la resposta immunològica i que, per tant, podrien ser considerats gens candidats a tenir un paper en la patogènia de l'RPM. Així, per exemple, el gen BAT1 (*HLA-B associated transcript 1*) és un membre de la família de gens anomenada DEAD que codifiquen per a helicases d'RNA. Aquesta proteïna pot regular la traducció dels mRNA de les citocines. El gen mapa entre el clúster de TNF i l'HLA-B i té un únic polimorfisme descrit que es troba associat a l'HA 8.1. Això no obstant, aquest polimorfisme és un canvi de base situat a l'intró 9, per la qual cosa no és probable que afecti la funció de la proteïna (Degli-Esposti MA, 1992b).

El gen IKBL codifica per a una proteïna que s'assembla a la família de proteïnes IκB involucrada en la regulació dels factors de transcripció nuclears NFκB/Rel. Aquesta família es caracteritza per la presència d'unes seqüències repetitives (o anquirines) que participen directament en les interaccions proteïna-proteïna i poden ser el mecanisme pel qual les proteïnes de la família IκB eviten la traslocació de l'NFκB cap al nucli on estimula la transcripció de citocines de fase aguda. L'NFκB pot ser un modulador de la resposta inflamatòria pel seu paper en la producció de TNF i en l'apoptosi. La majoria de membres de la família IκB contenen 5 o 6 repeticions, mentre que el gen IKBL en conté 2,5. A més a més, la seqüència d'aquesta proteïna no conté el senyal de degradació PEST que es troba en altres IκB, però té un motiu de cremallera de leucines característic d'alguns factors de transcripció. Malgrat que és un bon candidat, per les seves característiques, no s'ha descrit fins al moment cap variant genètica de l'IKBL associada a l'HA 8.1 (Albertella MR i col·l., 1994).

A la regió central de l'MHC mapen tres gens de les *heat shock protein 70* (HSP70-1, HSP70-2 i HSP70-Hom). Les proteïnes HSP70 són importants transportadors (*chaperons*) moleculars en la presentació i processament de l'antigen (Suto R and Srivastava PK, 1995). S'han descrit tres polimorfismes per al gen HSP70-1 i dos a cada un dels gens HSP70-2 i HSP70-Hom. Recentment s'han definit combinacions al·lèliques d'aquests gens específiques per a diferents haplotips, entre les quals hi ha l'HA 8.1 (Kok CC i col·l., 1999). Tanmateix, la rellevància d'aquests polimorfismes en la funció i expressió de la proteïna és poc coneguda. Així per exemple, un dels polimorfismes de l'HSP70-1 està localitzat a la regió 5'UTR del gen i, per tant, podria afectar-ne l'expressió. En el gen HSP70-2, un dels polimorfismes es troba a la regió codificant, això no obstant, és un canvi de base silent.

Finalment, un dels polimorfismes del gen HSP70-Hom es troba a la regió codificant i en aquest cas produeix un canvi d'aminoàcid.

Existeixen altres gens que poden influir en la regulació immunològica, tanmateix, no hi ha treballs que hagin analitzat la seva seqüència per buscar polimorfismes. Entre aquest podem citar el gen G1, que és l'homòleg humà del gen AIF-1 de rata que afecta el rebuig de trasplantaments. L'AIF-1 s'expressa predominantment en macròfags i està regulat per l'IFN- $\gamma$ . La seqüència d'aminoàcids té homologia amb motius que es troben en proteïnes d'unió al calci i que participen en l'activació de neutròfils (Devery JM i col·l., 1994). Un altre gen, BAT3 (*HLA-B associated transcript 3*), conté en la seva seqüència una zona homòloga a la ubiquitina (una proteïna relacionada amb les HSP70 que actua també de transportador molecular) i un motiu similar a les cremalleres de leucina que contenen les proteïnes d'unió a l'DNA. És possible que el gen BAT3 codifiqui per a un factor de transcripció, no obstant això cal fer més estudis per caracteritzar-lo millor. Aquest gen és interessant ja que s'ha trobat un polimorfisme associat a l'HA 8.1 (Degli-Esposti MA i col·l., 1992c).

En aquesta zona mapen tres gens més que per la seva funció cal tenir en compte: la caseïna quinasa  $\beta$  (CKII $\beta$ ), el gen G9 i el BAT8. La CKII participa en la regulació del creixement cel·lular i del metabolisme. El gen G9 codifica per a una sialidasa. Aquestes proteïnes participen en l'activació, diferenciació, maduració i creixement cel·lular (Milner CM i col·l., 1997). L'homòleg murí del gen G9, Neu1, té tres al·lels que afecten l'eficiència de la sialidació de les fosfatases àcides hepàtiques. L'expressió de G9 està augmentada en cèl·lules T després de la seva activació i pot ser important en la regulació de la resposta immunològica. Per exemple, l'activitat sialidasa citosòlica s'incrementa en resposta a l'activació de les cèl·lules T i pot ser la responsable de la hiposial·lidació de glicoproteïnes com ara les molècules de l'HLA de classe I. D'altra banda, el gen BAT8 conté 6 repeticions tipus anquirina similars a les trobades en el gen IKBL i, per tant, també és possible que sigui un nou membre de la família de proteïnes I $\kappa$ B que participen en la regulació transcripcional (Milner CM, and Campbell RD, 1993).

Finalment, vam creure d'interès incloure l'anàlisi de la preeclàmpsia en el nostre estudi ja que aquesta és una patologia freqüent de l'embaràs, amb una incidència de l'1-5%. A més a més, és una de les causes principals de morbiditat fetal i materna. En diferents estudis epidemiològics s'ha pogut determinar que la preeclàmpsia té un fort component

familiar. D'altra banda, s'ha observat que el TNF- $\alpha$  està incrementat en pacients amb aquesta patologia i, per tant, aquesta citocina podria tenir un paper important com a factor etiològic de les diferents alteracions que acompanyen la preeclàmpsia.

El conjunt d'aquests precedents ens va portar a hipotetitzar que l'augment dels nivells de TNF- $\alpha$  que acompanyen la preeclàmpsia també podria estar associat amb el polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$ .

Tanmateix, els resultats obtinguts van mostrar que la freqüència de l'al·lel TNFA2 no està incrementada en el grup de pacients amb preeclàmpsia. Aquests resultats concorden amb les dades publicades per altres autors on tampoc s'ha trobat una associació amb aquest al·lel. Per tant, segons tots aquests resultats, cal pensar que aquesta variant en el promotor del gen del TNF- $\alpha$  probablement no és un factor genètic important en el desenvolupament d'aquesta patologia.

La idea actual és que probablement la patogènia de la preeclàmpsia no sigui deguda a un únic gen responsable. Es pot suposar que un clúster de polimorfismes, possiblement en conjunció amb factors ambientals, predisposa a desenvolupar aquesta malaltia. En aquest sentit, recentment s'ha assenyalat que el sistema reninaangiotensina i l'expressió de determinats antígens de l'HLA podrien tenir un paper significatiu en el desencadenament d'aquest procés. Per tant seria interessant analitzar la contribució dels diferents polimorfismes descrits en aquests gens, sense descartar la possibilitat que també altres polimorfismes del gen del TNF- $\alpha$  podrien estar-hi associats.

# **Conclusions**

Les conclusions obtingudes a partir dels resultats de l'estudi i presentades en aquesta tesi són les següents:

1. El part normal representa una situació fisiològica en la qual s'observa un increment del clivatge dels receptors solubles del TNF- $\alpha$  i una disminució dels receptors de membrana tant en sang perifèrica materna com en sang de cordó, en comparació amb les dones control no embarassades. Aquests canvis fisiològics poden proporcionar un mecanisme de protecció conferint una major capacitat per tamponar l'efecte nociu d'un excés de TNF- $\alpha$  durant la gestació.
2. Tant les mares com els nadons presenten una expressió constitutiva dels receptors TNFR-p55 i p75 en cèl·lules leucocitàries. Això dona al nouat una capacitat de resposta pròpia no dependent de la mare.
3. En el context d'una infecció intrauterina es produeix un augment de les concentracions dels receptors solubles del TNF- $\alpha$  en sang perifèrica materna, en sang de cordó i en líquid amniòtic, la qual cosa suggereix que aquests receptors tenen una funció homeostàtica, atenuant els efectes nocius de l'excés de TNF- $\alpha$  associat al part patològic.
4. En el nadó la producció de receptors solubles del TNF- $\alpha$  és màxima en presència de signes clínics i/o biològics d'infecció durant les primeres 24 hores de vida.
5. Les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  s'incrementen significativament en nounats amb sèpsia i amb xoc sèptic durant les primeres 24 hores de vida.
6. La concentració plasmàtica de TNF- $\alpha$  és un factor pronòstic de l'evolució clínica i presenta una sensibilitat i especificitat moderada com a marcador de sèpsia neonatal.
7. La determinació simultània de les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  i dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 augmenta significativament la sensibilitat i l'especificitat de la prova diagnòstica, i assoleix unes característiques de fiabilitat aptes per a l'ús clínic com a marcador de sèpsia neonatal.
8. Les concentracions plasmàtiques dels receptors solubles sTNFR-p55 i p75 poden ser uns marcadors útils per monitoritzar l'evolució clínica de la sèpsia en nounats.

9. En els nounats amb xoc sèptic s'evidencia una alteració de la relació molar entre el TNF- $\alpha$  i els seus receptors solubles, situació que pot ser una de les causes que donen lloc al fracàs de la resposta inflamatòria.
10. En població espanyola control la freqüència dels al·lels del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  concorda amb la descrita en altres poblacions caucàsiques i africanes.
11. En població espanyola control l'al·lel TNFA2 presenta un fort desequilibri de lligament amb l'haplotip HLA A1, B8, DRB1\*03.
12. Existeix una associació entre l'al·lel TNFA2 i una major susceptibilitat a presentar parts prematurs precedits d'una ruptura prematura de membranes. Aquesta associació no és independent de l'haplotip de l'HLA A1, B8, DRB1\*03.
13. L'al·lel TNFA2 i l'haplotip HLA A1, B8, DRB1\*03 poden ser uns marcadors útils per a identificar dones amb major risc de patir ruptura prematura de les membranes fetals preterme.
14. Cap dels al·lels del polimorfisme -308 pb del TNF- $\alpha$  no està associat ni amb el part preterme idiopàtic ni amb la preeclàmpsia, la qual cosa indicaria que aquestes variants del promotor del gen del TNF- $\alpha$  no són un factor genètic rellevant en l'etiologia d'aquestes patologies.



*VIII*  
PART

---

**Material i mètodes**

## 7.1. Població d'estudi

### I. Població d'estudi corresponent a l'objectiu 1

L'estudi de l'expressió i de les concentracions dels receptors del TNF- $\alpha$ , presents en els diferents compartiments de la unitat maternofetal durant el part normal i el part amb risc o signes d'infecció es va realitzar en els grups de pacients següents:

- Un grup control de dones adultes no embarassades, donants de sang del nostre hospital, totes van presentar una història clínica i analítica normal.
- Un grup de dones embarassades de les quals en el moment del part es va obtenir de forma simultània mostres de sang perifèrica, líquid amniòtic i les corresponents sangs de cordó. Aquestes mostres es van dividir en dos grups atenent la història clínica que presentaven les mares:
  - Grup de dones amb part a terme (part a partir de la setmana 37 de gestació) i que no van mostrar signes d'infecció durant el part.
  - Grup de dones que van presentar risc o signes d'infecció en el moment del part.

El risc d'infecció va incloure totes les dones que van presentar parts preterme (part entre la setmana 22 i 36 de gestació), ruptura prematura o prolongada de les membranes fetals (de més de 24 hores) i colonització urogenital o rectal per microorganismes patògens (principalment, *Streptococcus agalactiae* grup B).

Es van considerar signes d'infecció el fet de presentar corioamnionitis o almenys un dels símptomes següents: febre materna ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$  en dues mesures separades 6 hores), amnionitis, valors elevats de PCR, leucocitosi, neutropènia, fórmula diferencial amb desviació a l'esquerra de 5 o més bandes, cultiu positiu per microorganismes patògens del líquid amniòtic, etc. El diagnòstic de corioamnionitis es va basar en la presència de febre materna ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$  en dues mesures separades 6 hores), taquicàrdia materna o fetal i meconi a més a més de donar positiu almenys en una de les següents proves de laboratori: proteïna C reactiva (PCR)  $> 10$  mg/l, leucocitosi ( $\geq 15.000$  leucòcits/ $\mu\text{l}$ ), fórmula diferencial amb desviació a l'esquerra de 5 o més bandes, cultiu positiu per microorganismes patògens del líquid amniòtic i diagnòstic de corioamnionitis per anatomia patològica.

- Addicionalment, es van obtenir mostres de sang de cordó tant de parts normals com de parts amb risc o signes d'infecció.

## II. Població d'estudi corresponent a l'objectiu 2

Per a l'anàlisi de la concentració de TNF- $\alpha$  i dels seus receptors en nounats amb signes d'infecció i la determinació de si aquestes citocines poden ser utilitzades com a marcadors d'infecció neonatal i de l'evolució clínica, es van avaluar 170 nounats amb risc d'infecció admesos a la Unitat de Neonatologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol. El reclutament dels pacients va ser anterior a l'any 1997, moment en el qual es va instaurar el protocol de profilaxi de la infecció per estreptococ del grup B. Segons l'evolució clínica, aquests nadons es van dividir, retrospectivament, en els grups següents:

- Grup de 126 nounats no infectats: cap d'ells no va desenvolupar signes clínics o de laboratori d'infecció i no van rebre antibiòtics. Aquests pacients es van utilitzar com a controls.
- Grup de 38 nadons amb sèpsia. La sèpsia es defineix com la presència de dos o més dels criteris per SIRS: temperatura  $> 38^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$ , taquicàrdia (freqüència cardíaca  $> 160$  pulsacions/minut), taquipnea (freqüència respiratòria  $> 60$  inspiracions/minut), recompte leucocitari  $> 15.000$  leucòcits/ $\mu\text{l}$  o  $< 4.000$  leucòcits/ $\mu\text{l}$  o una ràtio de neutròfils immadurs/totals  $\geq 0,2$ .
- Grup de 6 nounats amb xoc sèptic, caracteritzat per sèpsia amb hipotensió (TA sistòlica  $<$  percentil 5 per a cada edat) que no respon a la infusió de líquid i afectació de la perfusió d'algun òrgan (que pot incloure, però no està limitada a oligúria, acidosi làctica, hipoxèmia o alteracions mentals agudes).

## III. Població d'estudi corresponent a l'objectiu 3

A fi de caracteritzar el paper del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  en el desencadenament del part preterme o del trencament prematur de membranes vam dur a terme un estudi de cohorts amb dones admeses a la Unitat de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Germans Trias i Pujol des de l'any 1997 fins a l'any 2000. Per a la tipificació d'aquest polimorfisme en la població espanyola es van recollir mostres de donants de sang del nostre hospital durant el mateix període de temps.

Les anàlisis es van restringir a individus de raça caucàsica per tal de minimitzar els factors de confusió per la variació de les freqüències al·lèliques entre ètnies.

El grup de pacients es va definir com a dones amb parts preterme precedits per una ruptura prematura de les membranes fetals (RPM) o dones amb amenaça de part prematur i membranes íntegres (APP). Cadascun dels dos grups es va analitzar comparant les pacients que van presentar corioamnionitis o signes d'infecció a l'ingrés o en el moment del part amb les que no en van presentar.

L'RPM es va objectivar per visualització directa de la pèrdua de líquid amniòtic, per determinació del pH vaginal i per ecografia amb determinació de l'índex amniòtic. L'índex amniòtic és la determinació del diàmetre major de les zones anecogèniques amb absència de parts fetals i/o cordó umbilical en cada un dels quatre quadrants en què es divideix virtualment la cavitat uterina. L'índex amniòtic és el resultat de sumar tots quatre valors. Es considera oligoàmnios quan és inferior o igual a 6, cosa que suggereix la presència d'RPM.

L'APP es defineix en tota aquella pacient amb edat gestacional inferior a 37 setmanes que presenta dinàmica uterina regular, registrada mitjançant tocografia externa, i modificació del coll uterí. De forma addicional, l'anàlisi dels resultats en el grup de dones que van presentar APP es va realitzar estratificant les pacients atenent la resposta al tractament tocolític inhibitori del part. El tractament tocolític que va rebre aquest grup de pacients va ser Ritodrine a dosis uteroinhibitòries (50-250 mg/minut) fins al cap de 24 hores més enllà de l'objectivació de la uteroinhibició o Nifedipine a dosis de 10-20 mg/6 hores. Els tractaments no es van mantenir més enllà de la setmana 36 de gestació.

Durant la realització d'aquest estudi es va incloure un grup addicional de pacients que van presentar preeclàmpsia. La preeclàmpsia es va diagnosticar en dones que la van presentar hipertensió acompanyada de proteïnúria. La hipertensió es va definir com pressió sanguínia persistent  $\geq 140/90$  mmHg desenvolupada durant l'embaràs després de la setmana 20 de gestació i que es va resoldre en les 6 setmanes posteriors al part. La proteïnúria es va definir com la presència persistent de proteïna en orina de més de 300 mg excretats en 24 hores.

El grup control va incloure dones que van tenir parts a terme després d'un embaràs sense complicacions.

## **7.2. Obtenció i processament de les mostres**

### **7.2.1. Obtenció i processament de les mostres de sang**

Totes les mostres de sang es van recollir en tubs d'EDTA-K<sub>3</sub> estèrils.

Les mostres de nounats ingressats a la Unitat de Neonatologia es van obtenir per punció en vena durant les primeres 24 hores de vida. En els pacients amb sèpsia es va obtenir una mostra en el moment del diagnòstic i en els casos en que va ser possible, una segona al cap de les 48 hores i una tercera al cap de les 72 hores. Per raons ètiques, la sang dels nounats ingressats sols es va obtenir si la punció havia de ser realitzada per altres motius mèdics.

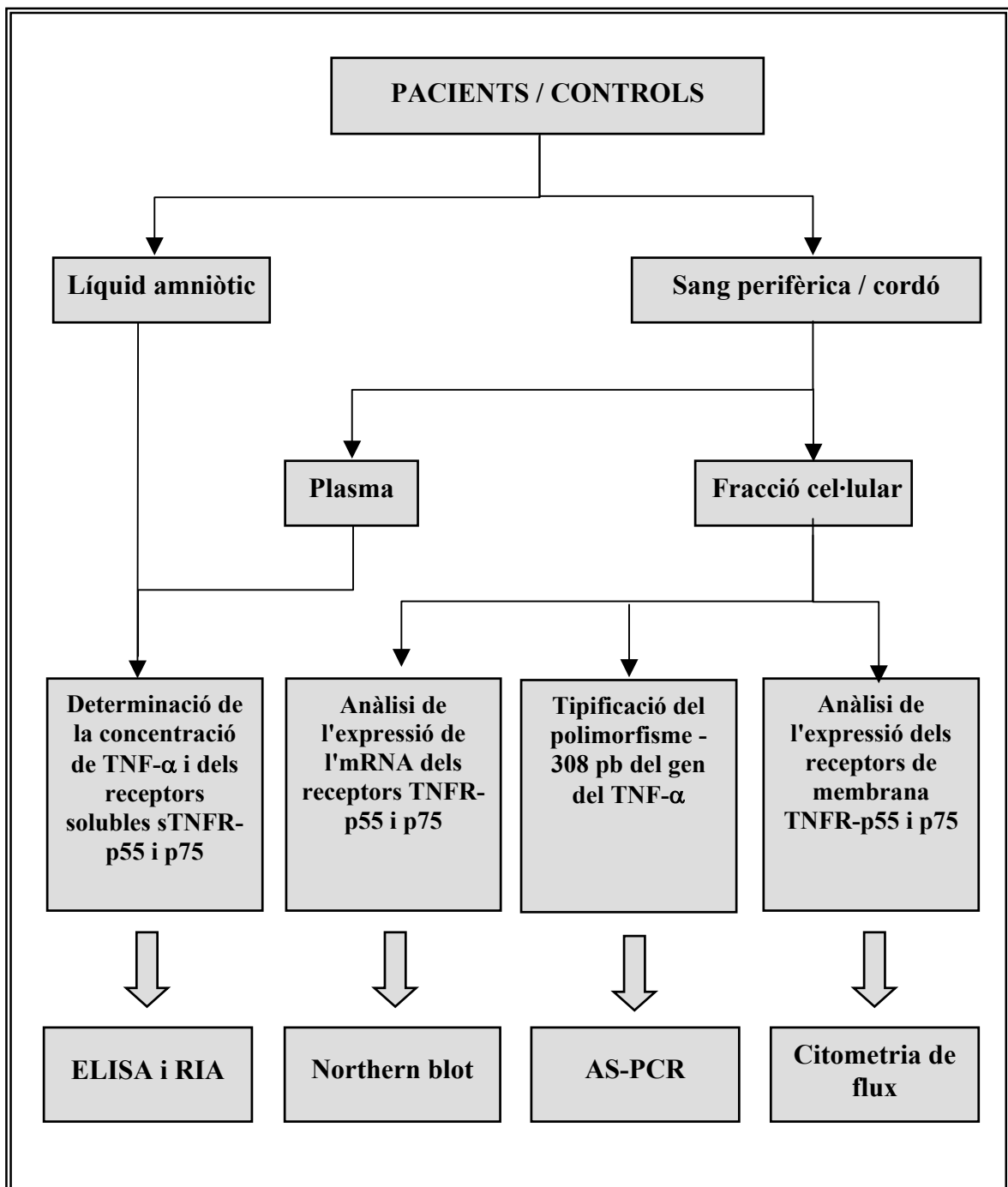
En l'estudi del TNF- $\alpha$  i dels seus receptors a la unitat maternofetal, un cop recollida la mostra se'n substreia la part necessària per a l'anàlisi mitjançant citometria de flux i la resta de la mostra es centrifugava a 2.000 rpm durant 10 minuts per tal de separar el plasma de la fracció cel·lular. De cadascuna d'aquestes parts es van fer alíquotes i es van guardar a -70°C. Totes les mostres es van processar en 1 o 2 hores des de la seva recol·lecció.

El processament de les mostres corresponents a l'estudi del polimorfisme -308 pb del gen del TNF- $\alpha$  es descriu a l'apartat 7.7.1.

### **7.2.2. Obtenció i processament de les mostres de líquid amniòtic**

El líquid amniòtic es va obtenir mitjançant el catèter transcervical de registre de la dinàmica uterina. Després de la recol·lecció, les mostres de líquid amniòtic es van centrifugar a 2000 rpm durant 10 minuts per descartar-ne les cèl·lules i el sobrenedant i es va congelar a -20°C.

Figura 7.1. Esquematització del processament de les mostres i de les principals tècniques utilitzades.



### 7.3. Cultius cel·lulars

En aquest treball es va utilitzar la línia cel·lular HL60 així com cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) estimulades com a controls positius de l'expressió dels receptors del TNF en l'anàlisi mitjançant Northern blot i per a la posada a punt de la tècnica d'immunotinció.

#### 7.3.1. Cultiu de les cèl·lules HL60

La línia cel·lular HL60 es va aïllar l'any 1979 a partir dels leucòcits de sang perifèrica obtinguts per leucoforesi d'una pacient amb leucèmia promielocítica aguda. Aquestes cèl·lules tenen morfologia de limfoblast i creixen en suspensió en medi RPMI 1640 (BioWhittaker) suplementat amb el 10% (v/v) de sèrum boví fetal (FBS), 2 mM de glutamina, 40 µg/ml de gentamicina i 400 unitats/ml de penicil·lina en atmosfera humida, 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Les cèl·lules van ser testades periòdicament per controlar possibles contaminacions amb micoplasma (per la tècnica de PCR). La línia es va comprar a l'*American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA).

#### 7.3.2. Obtenció de PBMC

Els PBMC es van obtenir per separació en gradient de Ficoll/Hipaque a partir d'uns 10 ml de sang recollida en tubs amb EDTA-K<sub>3</sub>. Aquestes mostres es van diluir 1/2 amb medi RPMI 1640 (BioWhittaker) suplementat amb el 10% (v/v) de sèrum boví fetal (FBS), 2 mM de glutamina, 40 µg/ml de gentamicina i 400 unitats/ml de penicil·lina. Un cop diluïda la sang es va dipositar sobre Ficoll (Ficoll Hypaque Lymphoprep, Amersham Pharmacia Biotech) en una proporció 2:1 (v/v), respectivament, i es va centrifugar a 1400 rpm durant 30 minuts a temperatura ambient. Després, es van recollir les cèl·lules mononuclears, que se situen a la interfase, i es van sotmetre a diferents rentats amb medi RPMI suplementat. Finalment, es va fer un recompte cel·lular i se'n va valorar la viabilitat amb blau tripà. Les cèl·lules es van posar en cultiu o bé es van criopreservar per a la seva utilització posterior, resuspenent-les en un medi consistent amb FCS i DMSO fred al 10% i deixant-les 30 minuts en vapors d'N<sub>2</sub> líquid.

### **7.3.3. Cultiu i estimulació de PBMC**

Els PBMC es van cultivar en flascons de 75 cm<sup>2</sup> a una concentració d'1.10<sup>6</sup> cèl·l./ml de medi RPMI 1640 suplementat amb FCS al 10%, 2 mM de glutamina, 40 µg/ml de gentamicina i 400 unitats/ml de penicil·lina en atmosfera humida, 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. A fi d'estimular l'expressió dels receptors del TNF-α, el medi de cultiu es va suplementar amb 20 ng/ml d'IL-2 i 1µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). Les cèl·lules es van analitzar a diferents intervals de temps, i es va observar que el màxim d'estimulació en la producció d'mRNA i de proteïna es va produir al cap de 8 i 48 hores de cultiu, respectivament.



## **7.4. Determinació dels receptors p55 i p75 del TNF de membrana**

La tinció per immunofluorescència és una de les tècniques més utilitzades per a la detecció d'antígens de membrana. L'anàlisi de les tincions mitjançant citometria de flux, permet que cada cèl·lula individualment pugui ser analitzada per diferents paràmetres de forma simultània. A més de l'alta especificitat i sensibilitat, aquest mètode té la capacitat d'analitzar de forma ràpida un gran nombre de cèl·lules, cosa que és necessària per a poder fer determinacions estadísticament significatives.

En el nostre cas es va utilitzar aquest mètode per a l'anàlisi de l'expressió dels dos receptors de membrana del TNF (TNFR-p55 i TNFR-p75) en cèl·lules limfocitàries obtingudes de sang perifèrica i de sang de cordó.

### **7.4.1. Preparació de les mostres**

La tinció per immunofluorescència es va realitzar partint de sang total. La utilització de sang total en lloc de cèl·lules mononuclears aïllades va ser necessària ja que la poca quantitat de sang que és possible extreure dels nadons (1-2 ml) feia totalment inviable el procés comunament utilitzat de separació cel·lular per gradient de Ficoll. D'altra banda, aquests processos d'aïllament cel·lular poden comportar la pèrdua de certs tipus de cèl·lules i/o l'activació de diferents processos que alteren de forma artefactual els valors d'expressió dels receptors en membrana, com per exemple augmentant el clivatge dels receptors del TNF (Romeu M, Mestre M, González L, Valls A, Verdager J, Corominas M, Bas J, Massip E and Buendia E. *Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Journal of Immunological Methods.* 1992; 154: 7-10).

Per tant, la mesura dels receptors de membrana de cèl·lules en sang total no fraccionada proporciona una informació més fiable referent a l'estat dels receptors en cèl·lules no estimulades.

### 7.4.2. Anticossos

Per a cada anticòs primari i secundari es va determinar, mitjançant titulació, la concentració de treball òptima, és a dir, aquella que permetia la màxima tinció específica amb el mínim de tinció inespecífica.

**I. Anticossos primaris:** per a les tincions per immunofluorescència es van utilitzar els anticossos monoclonals que es descriuen a la taula següent.

Taula 7.2. *Anticossos primaris.*

Anticòs	Isotip	Especificitat	Procedència
- htr-9	IgG1	anti TNFR-p55	Dr. H. Loëtscher, Hoffman-La Roche, Basilea, Suïssa.
- utr-1	IgG1	anti TNFR-p75	Dr. H. Loëtscher, Hoffman-La Roche, Basilea, Suïssa.
- Simultest Leucogate [Anti-Hleu-1/Leu-M3]	IgG1/IgG2a	anti CD45/CD14	Becton Dickinson, San José, USA.

**II. Anticossos secundaris:** com a anticòs secundari es va utilitzar un anticòs de cabra F(ab')<sub>2</sub> anti IgG (H+L) de ratolí marcat amb FITC (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EUA).

### 7.4.3. Tincions en sang total

#### Protocol de tinció de cèl·lules limfocitàries

- Per a cada pacient es preparen quatre tubs amb 50 µl de sang total a cadascun:
  - tub 1: tinció amb l'anticòs Leucogate (CD45-FITC/CD14-PE [Anti Hle-1/Leu-M3])
  - tub 2: control negatiu
  - tub 3: tinció amb l'anticòs htr-9 (anti TNFR-p55)
  - tub 4: tinció amb l'anticòs utr-1 (anti TNFR-p75)
- S'hi afegeixen els anticossos primaris htr-9 i utr-1 en els tubs 3 i 4, respectivament, a una concentració final de 20 µg/ml.
- S'incuben les mostres durant 30 minuts a 4°C.
- Després de la incubació, es renten les mostres dues vegades amb medi de cultiu RPMI suplementat amb un 2% de FCS, centrifugant a 500 x g durant 10 minuts.
- S'hi afegeixen 5 µl de l'anticòs *leucogate* al tub 1 i 5 µl de l'anticòs secundari a una dilució final d'1/100 en els tubs 2, 3 i 4.
- S'incuben durant 30 minuts a 4°C, protegint les mostres de la llum.

7. Es lisa la sang mitjançant una incubació de les mostres durant 10 minuts a les fosques amb solució de lisi eritrocitària (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA).
8. Es renten les mostres 3 vegades.
9. Es resuspenen les cèl·lules amb 300 µl de PBS/paraformaldehid a l'1%.
10. De totes les mostres se'n van fer tincions per duplicat.

#### **7.4.4. Anàlisi de les tincions. Citometria de flux**

Les mostres es van analitzar en un citòmetre de flux FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) utilitzant el programa Lysis II.

La població de limfòcits es va seleccionar utilitzant marcadors específics (CD45-FITC/CD14-PE [Anti Hle-1/Leu-M3]) de limfòcits, monòcits i polimorfonuclears. Els resultats es van calcular a partir de l'anàlisi de 10.000 cèl·lules i es van expressar com a percentatge de cèl·lules tenyides, després de substreure els valors obtinguts dels controls negatius.

## **7.5. Determinació de les concentracions plasmàtiques i en líquid amniòtic de TNF i sTNFR**

### **7.5.1. ELISA**

La determinació en plasma i en líquid amniòtic dels receptors solubles del TNF es va realitzar mitjançant la tècnica d'ELISA, utilitzant dos kits comercials: sTNFR-RI-EASIA i sTNFR-RII-EASIA (Medgenix, Fleurus, Bèlgica).

Ambdós assaigs es basen en un sistema oligoclonal el qual utilitza una barreja d'anticossos monoclonals dirigits contra diferents epítops del receptor analitzat. La utilització de diferents anticossos monoclonals evita la hiperespecificitat i permet obtenir una major sensibilitat amb un menor temps d'incubació i un major rang de concentracions de la corba estàndard.

L'anticòs lligat a la placa microtiter captura els receptors presents a les mostres i als estàndards. El receptor capturat es detecta mitjançant un segon anticòs monoclonal marcat amb l'enzim peroxidasa de rave. El canvi de color catalitzat per la peroxidasa s'inicia amb l'addició d'un substrat que conté peròxid d'hidrogen i tetrametilbenzidina (TMB). Aquesta reacció s'atura afegint-hi  $H_2SO_4$  i posteriorment la placa es llegeix a una longitud d'ona de 450 nm (filtre de referència de 630-650 nm) en un lector ELISA.

La quantitat de substrat es determina colorimètricament mesurant-ne l'absorbància, que és proporcional a la concentració del receptor. La concentració de receptor en una mostra es determina per interpolació a una corba estàndard construïda amb concentracions conegudes de cada receptor.

La sensibilitat dels kits utilitzats, sTNFR-RI-EASIA i sTNFR-RII-EASIA, va ser de 50 pg/ml i de 0,1 ng/ml, respectivament.

### **7.5.2. IRMA**

Les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  es van determinar mitjançant un assaig immunoradiomètric (TNF- $\alpha$ -IRMA, Medgenix, Fleurus, Bèlgica).

Amb aquesta tècnica, la concentració de TNF- $\alpha$  de les mostres es determina per la quantitat d'anticòs monoclonal marcat amb  $I^{125}$  que s'ha unit a la citoquina, la qual prèviament ha estat capturada pels diferents anticossos monoclonals que es troben lligats al tub. Després d'haver fet diferents rentats per tal d'eliminar-ne tot l'anticòs [ $I^{125}$ ]-anti-TNF- $\alpha$  que no s'hi ha unit, la radioactivitat que resta en els tubs es quantifica amb un comptador de radiació gamma.

La concentració de TNF- $\alpha$  de les mostres s'obté per interpolació a una corba de calibratge construïda a partir de concentracions conegudes de TNF.

La sensibilitat d'aquest assaig immunoradiomètric va ser de 5 pg/ml.

Un punt que cal tenir en compte és que els anticossos utilitzats en aquest kit permeten detectar el TNF- $\alpha$  circulant total: en forma d'homotrimer lliure (que és la forma activa) o bé unit als receptors solubles i també el TNF en la forma de monòmer o oligòmer no unit.

## 7.6. Anàlisi de l'expressió d'mRNA per Northern blot

Mitjançant aquesta tècnica es va analitzar l'expressió d'mRNA dels receptors p55 i p75 del TNF en cèl·lules leucocitàries de sang perifèrica de mares i de les corresponents sangs de cordó. El procés realitzat per analitzar l'expressió gènica dels receptors del TNF- $\alpha$  va ser el següent:

1. Obtenció de l'RNA total de les mostres.
2. Quantificació de l'RNA obtingut.
3. Obtenció de les sondes .
  - Transformació bacteriana per electroporació.
  - Obtenció del DNA plasmídic.
  - Obtenció del cDNA.
4. Electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant.
5. Transferència a membrana de niló.
6. Hibridació amb la sonda complementària marcada amb  $^{32}\text{P}$ .
7. Exposició a pel·lícula fotogràfica i revelat.
8. Quantificació i anàlisi per densitometria.

### 4.6.1. Obtenció d'RNA total

L'extracció d'RNA total es va realitzar a partir de sang total. El protocol es basa en el mètode descrit per P. Chomczynski i N. Sacchi amb alguna modificació (Analytical Biochemistry 162: 152-159, 1987).

#### Protocol

1. A cada al·líquota de 200  $\mu\text{l}$  de sang total, s'afegeixen 500  $\mu\text{l}$  de solució desnaturalitzant, que conté isotiocianat de guanidina 4 M, citrat sòdic 25 mM, 0,5% de sarcosil i 0,1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol.
2. Es passa la solució per una xeringa de dues a tres vegades. Això redueix la viscositat de la mostra, cosa que facilita la recuperació de la fase aquosa en els passos posteriors sense interferències de DNA genòmic.
3. S'hi afegeixen 200  $\mu\text{l}$  d'etanol absolut i es deixa 5 minuts en gel.
4. Es centrifuga 15 minuts a 10.000 x g i a 4°C.
5. Se'n descarta el sobrenedant.
6. Es resuspèn el precipitat amb 150  $\mu\text{l}$  de la solució desnaturalitzant i 15  $\mu\text{l}$  d'acetat sòdic 2 M (pH = 4,2).
7. S'hi afegeix un volum igual de fenol-cloroform (10:4 v/v) i es barreja per inversió. Es deixa 10 minuts en gel.

8. Es centrifuga 15 minuts a 10.000 x g i a 4°C.
9. Es recupera la fase superior aquosa, s'hi afegeix un volum d'isopropanol a temperatura ambient i es barreja per inversió.
10. Es deixa un mínim de 30 minuts precipitant a -20°C.
11. Es centrifuga 30 minuts a 10.000 x g i a 4°C.
12. Se'n descarta el sobrenedant i es renta amb 200 µl d'etanol al 75% i a temperatura ambient.
13. Es centrifuga 10 minuts a 10.000 x g i a 4°C.
14. Se n'elimina bé l'etanol i s'asseca.
15. Es resuspèn en aigua tractada amb 0,1% de dietilpirocarbonat (DEPC) i es deixa la mostra 3 minuts a 65°C.
16. Es guarda l'RNA congelat a -70°C.

## 7.6.2. Quantificació de l'RNA

La concentració de l'RNA es va determinar per espectrofotometria. El principi es basa en la quantitat de llum ultraviolada que són capaços d'absorbir els àcids nuclèics. Llegint l'absorbància a una longitud d'ona de 260 nm ens permet determinar la concentració d'àcid nuclèic de la mostra i a 280 i 320 nm la quantitat de proteïnes i de sals, respectivament. El quocient entre l'absorbància a 260 nm i la corresponent a 280 nm s'utilitza per determinar la puresa de la mostra. Un quocient d'1,8 o superior indica una puresa molt elevada.

La integritat de l'RNA es va analitzar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% en TBE 1X (Tris 89 mM, àcid bòric 89 mM, EDTA 0,05 mM, pH = 8,3), utilitzant 2µg d'RNA de cada mostra.

## 7.6.3. Obtenció de les sondes

### 7.6.3.1. Plàsmids utilitzats

Els plàsmids que contenen les sondes per a l'anàlisi de l'mRNA dels receptors TNFR-p55 i p75 són els següents:

- *pUC19/p55* i *pUC19/p75*: els quals contenen el cDNA dels gens TNFR-p55 i TNFR-p75 respectivament (2,1 Kb). Ambdós vectors van ser cedits gentilment pel Dr. H. Loëtscher (Hoffman-La Roche, Basilea, Suïssa).

Tots els plàsmids utilitzats són de clonació procariota i porten incorporat el gen de resistència a l'ampicil·lina, el qual es va utilitzar posteriorment per seleccionar els bacteris transfectats. Els vectors van ser utilitzats per a la transformació de la soca bacteriana d'*Escherichia coli* XL-1 blue mitjançant la tècnica d'electrotransformació. Posteriorment, es va expandir el cultiu bacterià i es va extreure el DNA plasmídic. El vector purificat es va digerir amb els enzims de restricció adients per a cada sonda i els fragments de cDNA es van separar en un gel d'agarosa. Les bandes corresponents es van retallar del gel i es van purificar.

A continuació es detallen els protocols utilitzats en cada pas:

### 7.6.3.2. Transformació bacteriana per electroporació

#### I. Preparació de les cèl·lules:

Les cèl·lules utilitzades van ser la soca bacteriana *d'Escherichia coli*, XL1-blue MRF':  $\Delta$  (mcrA) 183 $\Delta$  (mcrCB-hsdSMB-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 lac [F' proAB lac I<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (tet<sup>r</sup>)].

Es va inocular 3  $\mu$ l d'un estoc congelat dels bacteris XL-1 blue MRF' en 5 ml de medi LB "*Luria-Bertrani Broth*" (1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl, 1‰ NaOH 2N (v/v)) que contenia tetraciclina. El cultiu es va deixar a 37°C i 250 rpm tota la nit.

El cultiu obtingut es va utilitzar per inocular 1 l de medi LB en una proporció 1/100. Les cèl·lules es van fer créixer a 37°C en agitació (250 rpm) fins que es va obtenir una absorbància a 600 nm de 0,6-0,7 unitats de DO. Posteriorment, el cultiu es va deixar refredar en gel durant uns 30 minuts aproximadament. A partir d'aquí es va seguir el protocol següent:

1. Es centrifuga a 4.000 x g durant 15 minuts a 4°C.
2. Es resuspèn el precipitat cel·lular amb 1 l de medi de rentat de baixa força iònica fred (Hepes 1 mM, pH = 7).
3. Es centrifuga com en el pas anterior.
4. Es resuspèn el precipitat amb 0,5 l de medi que conté el 10% de glicerol.
5. Es centrifuga com es descriu en el punt 1.
6. Es resuspèn el precipitat en un volum final de 2 a 3 ml de medi amb un 10% de glicerol.



7. Aquesta suspensió es separa en alíquotes i se sotmet a una congelació ràpida amb neu carbònica o nitrogen líquid.
8. Les alíquotes es guarden congelades a -70°C fins al moment d'utilitzar-les.

## **II. Electrotransformació:**

### **Protocol:**

1. Es descongelen les cèl·lules a temperatura ambient i ràpidament es posen en gel.
2. Es posen 50 µl de la suspensió de bacteris en una cubeta d'electroporació freda i s'hi afegeix 1 µl del plàsmid que està a una concentració de 10 ng/ml. Cal barrejar-ho bé.

L'electroporació es du a terme en un aparell "Gene Pulser, BioRad" a 25 µF, 2,5 kV i 200 Ω.

3. S'hi afegeix ràpidament 500 µl de LB temperat dins la cubeta i es resuspèn.
4. S'incuben les cèl·lules a 37°C durant 1 hora amb agitació (250 rpm).

## **III. Selecció dels transformants**

La selecció de les cèl·lules transformades es va fer segons la resistència a l'ampicil·lina que els confereix el plàsmid incorporat. D'aquesta manera, només les cèl·lules transformades poden créixer en presència d'aquest antibiòtic. El procediment seguit és el que es detalla a continuació:

1. Se sembra 100 µl de les cèl·lules electrotransformades en una placa de Petri amb medi LB-agar i ampicil·lina (50 mg/ml).
2. S'incuben les plaques sembrades a 37°C tota la nit.

L'expansió de les cèl·lules transformades es va fer transferint una colònia a un tub de 15 ml que contenia 5 ml de medi de cultiu LB i 5 µl d'ampicil·lina (50 mg/ml). Posteriorment el cultiu s'incuba a 37°C tota la nit amb agitació (250 rpm).

### **7.6.3.3. Obtenció de DNA plasmídic**

L'obtenció del DNA plasmídic es va fer segons la tècnica descrita per Sambrook i col·laboradors (Sambrook J, Fritsch RF and Maniatis R; Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EUA). De forma general, aquest mètode consisteix en una degradació de la paret bacteriana seguida d'una lisi alcalina de l'esferoplast i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i proteïnes per acció d'una solució àcida d'acetat potàssic. El DNA plasmídic es purifica després mitjançant extraccions fenol-cloroform i precipitant amb etanol.

**Protocol:**

1. Es transfereix 1,5 ml del cultiu bacterià a un tub i es centrifuga a 12.000 x g durant 5 minuts a 4°C.
2. Se'n descarta el sobrenedant per aspiració.
3. Es resuspèn el precipitat en 100 µl de solució I freda. Cal barrejar-ho bé mitjançant vòrtex.

**Solució I**

Glucosa	50 mM
Tris-Cl (pH = 8)	25 mM
EDTA (pH = 8)	10 mM

4. S'hi afegeix 200 µl de solució II preparada en el moment d'utilitzar-la.

**Solució II**

NaOH	0,2 N
SDS	1%

5. Es barreja invertint el tub diverses vegades.
6. S'hi afegeix 150 µl de solució III freda.

**Solució III**

Acetat potàssic (pH = 5,5)	5 M
----------------------------	-----

7. Es barreja suaument i es deixa el tub 5 minuts en gel.
8. Es centrifuga a 12.000 x g durant 5' a 4°C i es transfereix el sobrenedant a un tub net.
9. S'afegeix un volum equivalent de fenol-cloroform-isoamilalcohol (25:24:1). Cal barrejar-ho i centrifugar a 12.000 x g durant 5 minuts a 4°C.
10. Es transfereix el sobrenedant a un tub net i s'afegeix un volum igual de cloroform-isoamilalcohol (24:1).
11. Es centrifuga a 12.000 x g durant 5 minuts a 4°C i es transfereix el sobrenedant a un tub net.
12. Es precipita el DNA amb 2 volums d'etanol absolut.
13. Es centrifuga a 12.000 x g durant 5 minuts a 4°C.
14. Es descarta el sobrenedant, s'afegeix 1 ml d'etanol del 70% fred i es centrifuga a 12.000 x g durant 5 minuts a 4°C.
15. Es descarta el sobrenedant i es deixa assecat el precipitat durant 10 minuts.
16. Es redissol el DNA amb 50 µl de TE (pH = 8) i RNasa pancreàtica (20 µg/ml).
17. Es guarda el DNA a -20°C.

**7.6.3.4. Obtenció del cDNA**

Els plàsmids obtinguts es troben en forma circular, tancada covalentment (supercoiled) i, en general, són susceptibles a ser sotmesos a manipulacions enzimàtiques per tal d'obtenir-ne el fragment de DNA específic que posteriorment s'utilitzarà com a sonda per a la detecció dels RNA missatgers (TNFR-p55 i TNFR-p75).

## **I. Digestió del DNA plasmídic amb enzims de restricció**

Les digestions de DNA requereixen d'unes condicions específiques per a cadascun dels diferents enzims que s'utilitzen. De forma general, es digereix el DNA en una relació de 2 unitats d'enzim per  $\mu\text{g}$  de DNA, utilitzant la solució adient segons les recomanacions de la casa comercial subministradora (Promega). El temps de digestió del DNA plasmídic oscil·lava entre 1 i 2 hores a  $37^\circ\text{C}$ .

Els fragments de cDNA escollits com a sondes per al TNFR-p55 i p75 corresponen, en ambdós casos, al domini citoplasmàtic dels receptors, ja que aquesta zona és la que presenta menor homologia entre els diferents membres d'aquesta família. La sonda de 305 pb utilitzada per a la detecció de l'mRNA del TNFR-p55 es va obtenir a partir d'una doble digestió del plàsmid pUC19/TNFR-p55 amb els enzims Eco R1 i Hind III. Per al TNFR-p75, el plàsmid pUC19/TNFR-p75 es va digerir amb l'enzim Pst I i entre els fragments generats es va seleccionar el corresponent a 669 pb.

## **II. Aïllament i purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa**

Els productes de les digestions es van separar per diferència de mobilitat electroforètica en gels d'agarosa de l'1 o l'1,5%, segons els casos, en TAE 1X (Tris-acetat 40 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,7). La banda de DNA corresponent a cadascuna de les sondes es va retallar del gel i es va purificar utilitzant el kit comercial JetSorb (Genomed, NC, EUA).

## **III. Quantificació de la sonda**

Un cop purificades les diferents sondes se'n va determinar la seva concentració comparant la intensitat de les bandes respecte d'un marcador de pes molecular conegut ( $\lambda$ -Hind III, Appligenene Oncor, Illkirch Cedex, França) en un gel d'agarosa/TAE 1X tenyit amb bromur d'etidi.

## **7.6.4. Electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant**

### **7.6.4.1. Preparació de les mostres**

De cada mostra es va agafar l'alíquota adient a fi de tenir 12 µg d'RNA total i s'hi va afegir solució desnaturalitzant (concentració final: formamida 50%, formaldehid 6%, MOPS 1X). Les mostres es van escalfar a 65°C durant 5 minuts i després, es van refredar ràpidament 5 minuts en gel. Posteriorment, s'hi va afegir el tampó de càrrega (5X: 20% Ficoll 400, 0,5% blau de bromofenol, EDTA 0,1M pH = 7,5) i es va fer l'electroforesi.

### **7.6.4.2. Preparació del gel**

Es prepara un gel d'agarosa a l'1%, formaldehid 6% i MOPS 1X (MOPS 0,2 M, acetat sòdic 0,05 M, EDTA 0,01 M, pH = 7).

### **7.6.4.3. Electroforesi**

L'electroforesi es va realitzar a 70 volts durant 4 hores en MOPS 1X. Una vegada acabada l'electroforesi, el gel es va rentar durant 1 hora amb H<sub>2</sub>O destil·lada, canviant-la cada 20 minuts i amb agitació per eliminar-ne el formaldehid. Finalment, el gel es va equilibrar amb SSC 20X (NaCl 3 M, citrat sòdic 0,3 M, pH = 7) durant una hora, i es va canviar tres vegades la solució.

## **7.6.5. Transferència a membrana de niló**

L'RNA del gel es va transferir a una membrana de niló carregada positivament (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham International, UK) per capil·laritat segons Sambrook i col·l. (Sambrook J, Fritsch RF and Maniatis R; Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EUA) durant un temps mínim de 18 hores.

Un cop finalitzada la transferència, la membrana es va rentar amb SSC 2X durant 1 hora, canviant 2 vegades la solució i l'RNA es va fixar amb llum UV en una càmera d'irradiació Stratallinker (Stratagene, San Diego, CA, EUA).

## 7.6.6. Hibridació amb la sonda complementària marcada amb $^{32}\text{P}$

### 7.6.6.1. Prehibridació de la membrana

La membrana amb l'RNA es va equilibrar durant uns quants minuts amb una solució de SSC 2X dins un tub per al forn d'hibridació. Seguidament, la membrana es va prehibridar durant 2 hores a 42°C amb 10 ml de solució:

- Formamida 50%
- Denhardts 5X
- SDS 0,5%
- SSPE 6X (20X: NaCl 3,6 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,2 M, EDTA 0,02 M, pH = 7,4)
- 100  $\mu\text{l}$  de DNA d'esperma de salmó (estoc 10 mg/ml) desnaturalitzat 5 minuts a 96°C

### 7.6.6.2. Hibridació de la membrana

La hibridació es va dur a terme durant 16 hores a 42°C amb 10 ml de solució:

- Formamida 50%
- Sulfat de dextrà 10%
- SDS 0,5%
- SSPE 6X
- 100  $\mu\text{l}$  de DNA d'esperma de salmó (estoc 10 mg/ml) desnaturalitzat 5 minuts a 96°C
- El volum de sonda marcada amb  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  desnaturalitzada per disposar de  $2 \times 10^6$  cpm/ml de solució.

### 7.6.6.3. Marcatge de les sondes

El marcatge radioactiu de les sondes es va dur a terme, segons la tècnica de *random priming extension*, amb  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (activitat 3000 Ci/mmol, Amersham), utilitzant el kit Prime-It II (Stratagene, EUA). Un cop marcada la sonda (30 ng per reacció), es van eliminar els nucleòtids  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  no incorporats amb les columnes de reïna Microspin<sup>TM</sup> S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Suècia).

L'eficiència del marcatge es va avaluar en un comptador Betamatic (Kontron, Milan, Itàlia).

#### **7.6.6.4. Rentats de la membrana**

Un cop finalitzada la hibridació amb la sonda corresponent, es va procedir a fer-ne els rentats per eliminar les unions inespecífiques de la sonda. Es van realitzar rentats successius cada cop de major astringència segons s'indica a continuació:

Per a membranes hibridades amb sonda específica del receptor RTNF-p55:

- 1 rentat ràpid amb SSC 2X/ SDS 0,1% a temperatura ambient.
- 2 rentats de 15 minuts amb SSC 2X/ SDS 0,1% a temperatura ambient.
- 1 rentat de 30 minuts amb SSC 0,1X/ SDS 0,1X a 60°C.

Per a membranes hibridades amb sonda específica del receptor RTNF-p75:

- 1 rentat ràpid amb SSC 2X/ SDS 0,1% a temperatura ambient.
- 2 rentats de 15 minuts amb SSC 2X/ SDS 0,1% a temperatura ambient.
- 1 rentat de 30 minuts amb SSC 0,1X/ SDS 0,1X a 65°C.

#### **7.6.7. Exposició a pel·lícula fotogràfica i revelat**

Després de fer els rentats, la membrana es va exposar a pel·lícula fotogràfica (X-Omat AR, Kodak) amb doble pantalla amplificadora a -70°C. El revelat de la pel·lícula es va fer amb un equip Kodak automàtic.

#### **7.6.8. Quantificació i anàlisi per densitometria**

La quantificació dels senyals es va fer per densitometria d'imatge en un equip BioRad. Els nivells d'expressió dels receptors RTNF-p55 i p75 es van calcular com la ràtio entre els pixels de la banda del RTNF-p55 o p75 i els de la banda de l'RNA ribosòmic 28S visualitzat en el gel d'agarosa per a cadascuna de les mostres, i quantificat igualment per densitometria amb el programa 1.7-Manager per a Windows 95 (TDI, Madrid, Espanya).

Per a cada una de les mostres, les dades d'expressió dels mRNA representen la ràtio següent:

$$\frac{\text{senyal d'mRNA mostra x} / \text{senyal 28S de la mostra x}}{\text{senyal d'mRNA control} / \text{senyal 28S del control}}$$

on el control representa un RNA, obtingut de les cèl·lules HL60, idèntic a totes les membranes que es van realitzar i que ens permet comparar les dades obtingudes de membranes diferents.

## 7.7. Anàlisi del polimorfisme -308 del promotor del TNF- $\alpha$

### 7.7.1. Preparació de les mostres

L'estudi del polimorfisme del promotor del gen del TNF- $\alpha$  es va realitzar a partir de DNA genòmic obtingut de leucòcits de sang perifèrica. De cada pacient es va extreure 10 ml de sang total, recollida en tubs d'EDTA-K<sub>3</sub>. Les mostres es van tractar tal com es descriu en el protocol següent:

1. Es centrifuga la sang a 2.000 rpm durant 10 minuts.
2. Es recull el plasma i es congela (el plasma es va utilitzar per determinar l'HLA soluble, procés que es va dur a terme als laboratoris del North London Transfusion Centre).
3. Es traspasa la part cel·lular a un tub de 20 ml i s'hi afegeix 3 V de solució de lisi d'eritròcits (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, HEPES 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH = 7,4).
4. Es deixen els tubs en agitació durant 30 minuts a temperatura ambient.
5. Es centrifuga a 2.000 rpm durant 10 minuts.
6. Se'n descarta el sobrenedant.
7. Es reparteix el precipitat en 4 tubs d'Eppendorf.
8. S'afegeix a cada tub 1,5 ml de solució de lisi d'eritròcits i es centrifuga a 3.000 rpm durant 5 minuts.
9. Se'n descarta el sobrenedant. Si el precipitat cel·lular queda vermell cal repetir el procés de l'apartat 8.
10. Es congelen els tubs a -20°C o bé es continua amb l'extracció del DNA tal com es descriu en l'apartat següent.

### 7.7.2. Obtenció de DNA genòmic

La tècnica utilitzada per a l'extracció del DNA genòmic es basa en la capacitat de la proteïnasa K i de l'SDS per dissoldre la mostra i es digereixen els components proteics sense afectar al DNA. Posteriorment, el DNA es purifica amb desnaturalitzants proteics (fenol-cloroform) i la fase aquosa que conté el DNA es precipita amb etanol i acetat sòdic.

#### Protocol:

1. Es dissol el precipitat de cèl·lules en 650  $\mu$ l de tampó de lisi de leucòcits.

#### Tampó de lisi de leucòcits \*

TRIS-HCl (pH = 8,5)	10 mM
Na Cl	5 mM
EDTA (pH = 8)	8 mM
SDS	1%
Proteïnasa K	0,5 mg/ml



(\*) *Aquests tampó es pot preparar i guardar a 4°C, però sense afegir la proteïnasa K i l'SDS, els quals s'afegeixen en fresc cada vegada.*

2. Es vorteja suaument i es deixa tota la nit incubant en un bany a 37°C.
3. S'hi afegeix 200 µl de NaCl 6 M.
4. S'agita fortament amb la mà fins que tot és escuma.
5. Es centrifuga a 6.000 rpm durant 5 minuts.
6. Se'n recull el sobrenedant i es passa a un tub net.
7. Es repeteix el pas de centrifugació i es recupera el sobrenedant.
8. S'hi afegeix 1 volum de fenol-cloroform-isoamilalcohol (25:24:1).
9. Es barreja suaument per inversió fins que la solució adquireix un aspecte blanquinós homogeni.
10. Es centrifuga a 12.500 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient.
11. Se'n recull el sobrenedant i es passa a un tub net.
12. S'hi afegeix 1 volum de cloroform-isoamilalcohol (24:1) i s'agita per inversió. Es repeteix el procés indicat en els punts 10 i 11.
13. Es precipita el DNA del sobrenedant que hem obtingut, afegint-hi 2 volums d'etanol absolut fred (-20°C) juntament amb 0,1 volum d'acetat sòdic 3 M (pH = 5,2), durant un mínim de 2 hores a -70°C.
14. Es centrifuga a 12.500 rpm durant 30 minuts a 4°C.
15. Se'n descarta el sobrenedant i s'afegeix 200 µl d'etanol al 70% sense resuspendre el DNA precipitat.
16. Es centrifuga a 12.500 rpm durant 5 minuts a 4°C.
17. Se'n extreu l'etanol i es deixa evaporar les restes de líquid que hi hagi quedat.
18. Es resuspèn el DNA en H<sub>2</sub>O bidestil·lada estèril, incubant-ho 10 minuts a 65°C. Si no es dissol bé es pot deixar a 37°C de 4 a 5 hores o més.

### 7.7.3. Quantificació i visualització del DNA

Igual que l'RNA, el DNA obtingut de cada mostra es va quantificar i se'n va determinar la puresa mitjançant espectrofotometria (vegeu l'apartat 7.6.2.).

La integritat del DNA es va comprovar carregant 2 µl del purificat juntament amb 2 µl de tampó de càrrega i 6 µl d'H<sub>2</sub>O, en un gel d'agarosa al 0,8% en TAE 1X. L'electroforesi es va dur a terme a un voltatge constant entre 70 i 80 V durant 1 hora aproximadament.

### 7.7.4. Obtenció dels estàndards

Com a control intern de la reacció d'amplificació es va dissenyar un constructe format per l'exó 4 del gen de la desmina humana, flanquejat per les seqüències

corresponents als iniciadors amb els quals es van tipificar els dos al·lels del TNF- $\alpha$  (C1 i C2 a l'extrem 5' del constructe i C3 en el 3', vegeu l'apartat 7.7.5) (figura 7.2). Per al seu disseny es va tenir en compte que s'amplifiqués amb els mateixos iniciadors que el DNA genòmic i que fos similar en mida al producte per tal que no interferís amb l'eficiència de la PCR.

El DNA estàndard s'afegia a cada reacció de PCR per tal de tenir un control positiu de l'amplificació i alhora ens permetia comprovar que no s'hagués produït cap error en la dispensació dels iniciadors corresponents en cada tub, cosa que ens hauria dut a una interpretació equivocada dels resultats.

El procés realitzat per a l'obtenció de l'estàndard va ser el següent:

1. Amplificació per PCR amb els iniciadors A2-5' i A1-3', utilitzant DNA genòmic com a motlle.
2. Separació del producte amplificat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1,5%.
3. Purificació de la banda d'amplificat corresponent a la mida esperada de 256 pb.
4. Amplificació per PCR amb els iniciadors A3-5' i C1, utilitzant com a motlle el producte obtingut de l'apartat anterior.
5. Finalment, es repeteix el procés seguit en els apartats 3 i 4 a fi d'obtenir el DNA estàndard de 276 pb.

### Condicions de la PCR:

Les reaccions d'amplificació per a l'obtenció de l'estàndard es van fer en un volum final de 50  $\mu$ l d'una solució de reacció que contenia: 0,5  $\mu$ M de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerasa, 250  $\mu$ M de cada dNTP, 67 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,1% de Tween-20. La seqüència dels iniciadors utilitzats es detalla a continuació:

**Taula 7.3. Iniciadors per a l'estàndard.**

---

Iniciador 3' (A1-3'): 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCGAGGCCTTGGGATTCCAGGGGG-3'

---

Iniciador 5' (A2-5'): 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGGAGATCCGTGAGTTGCA-3'

---

Iniciador 5' (A3-5'): 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGAATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'

---

*Tots tres iniciadors van ser dissenyats al nostre laboratori i sintetitzats per ARK Scientific.*

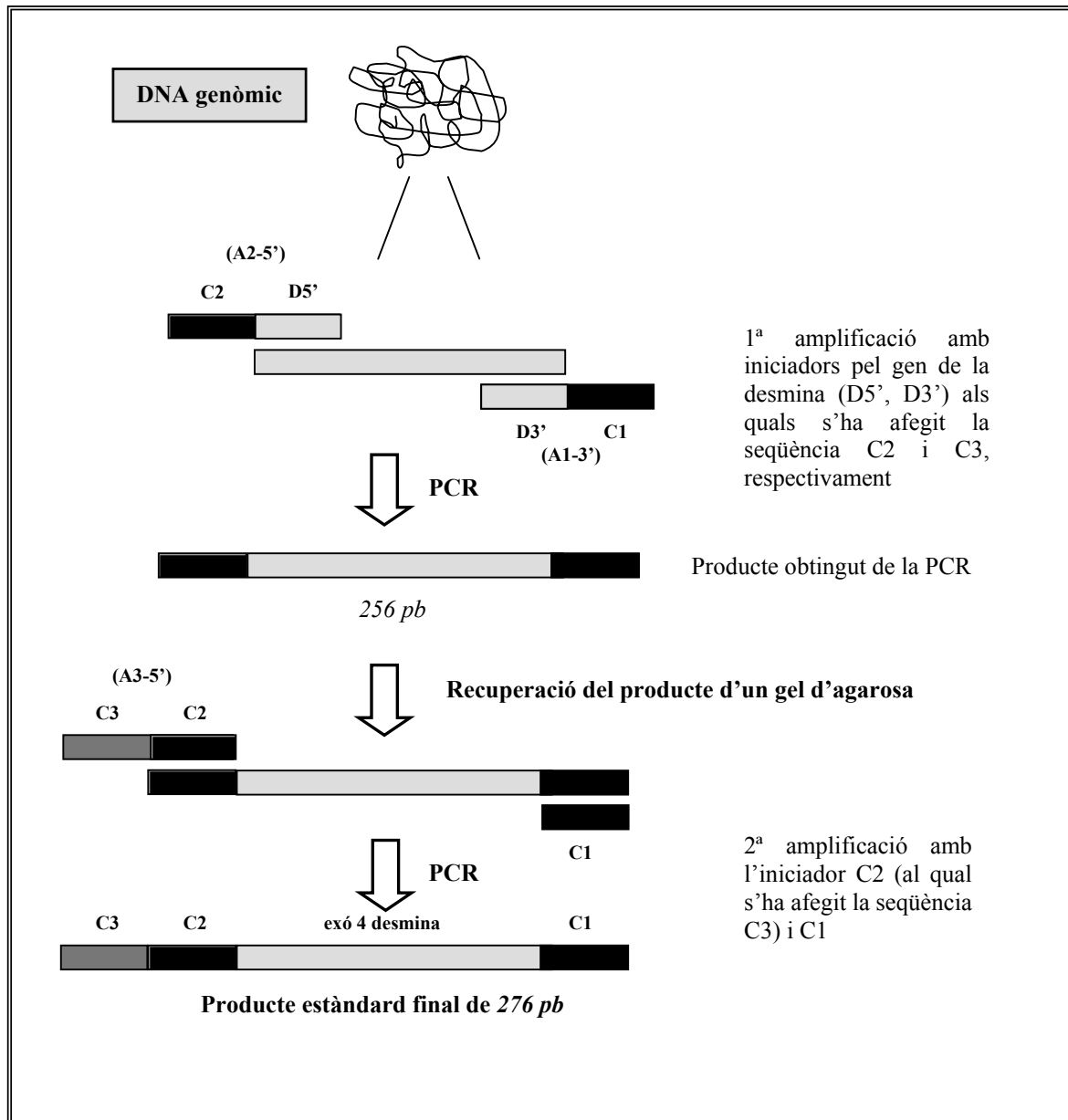
La PCR es va dur a terme en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Emerville, CA, EUA) sota les condicions següents:

1 cicle: - *desnaturalització*; 95°C, 5 min / *anellament*; 58°C, 1 min / *extensió*; 72°C, 1 min.

30 cicles: - *desnaturalització*; 95°C, 1,5 min / *anellament*; 58°C, 2,5 min / *extensió*; 72°C, 1 min.

1 cicle: - *extensió final*; 72°C, 7 min.

Figura 7.2. Esquema del procés seguit en l'obtenció de l'estàndard.



Un cop es va obtenir l'estàndard es va procedir a determinar-ne la concentració de treball més adient. Aquest procés va consistir en l'amplificació utilitzant diferents quantitats d'estàndard enfront a una quantitat de DNA de 100 ng per reacció. Finalment, es va determinar la quantitat d'estàndard a utilitzar en 1 pg per reacció d'amplificació.

### 7.7.5. AS-PCR

La tipificació del polimorfisme del gen del TNF- $\alpha$  en la posició -308 pb es va realitzar mitjançant la tècnica d'AS-PCR (*allele-specific polymerase chain reaction*). Aquesta tècnica es basa en la utilització d'iniciadors específics per a cada al·lel del polimorfisme (G  $\rightarrow$  A) del gen del TNF- $\alpha$ . Els iniciadors utilitzats (taula 7.4) són els descrits per Verjans G.M. i col·l. (*Verjans G.M, Brinkman B.M, Van Doornik C.E, Kijlstra A, Verweij C.L. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. Clin Exp Immunol 1994; 97:45-47*).

**Taula 7.4. Iniciadors utilitzats en l'AS-PCR.**

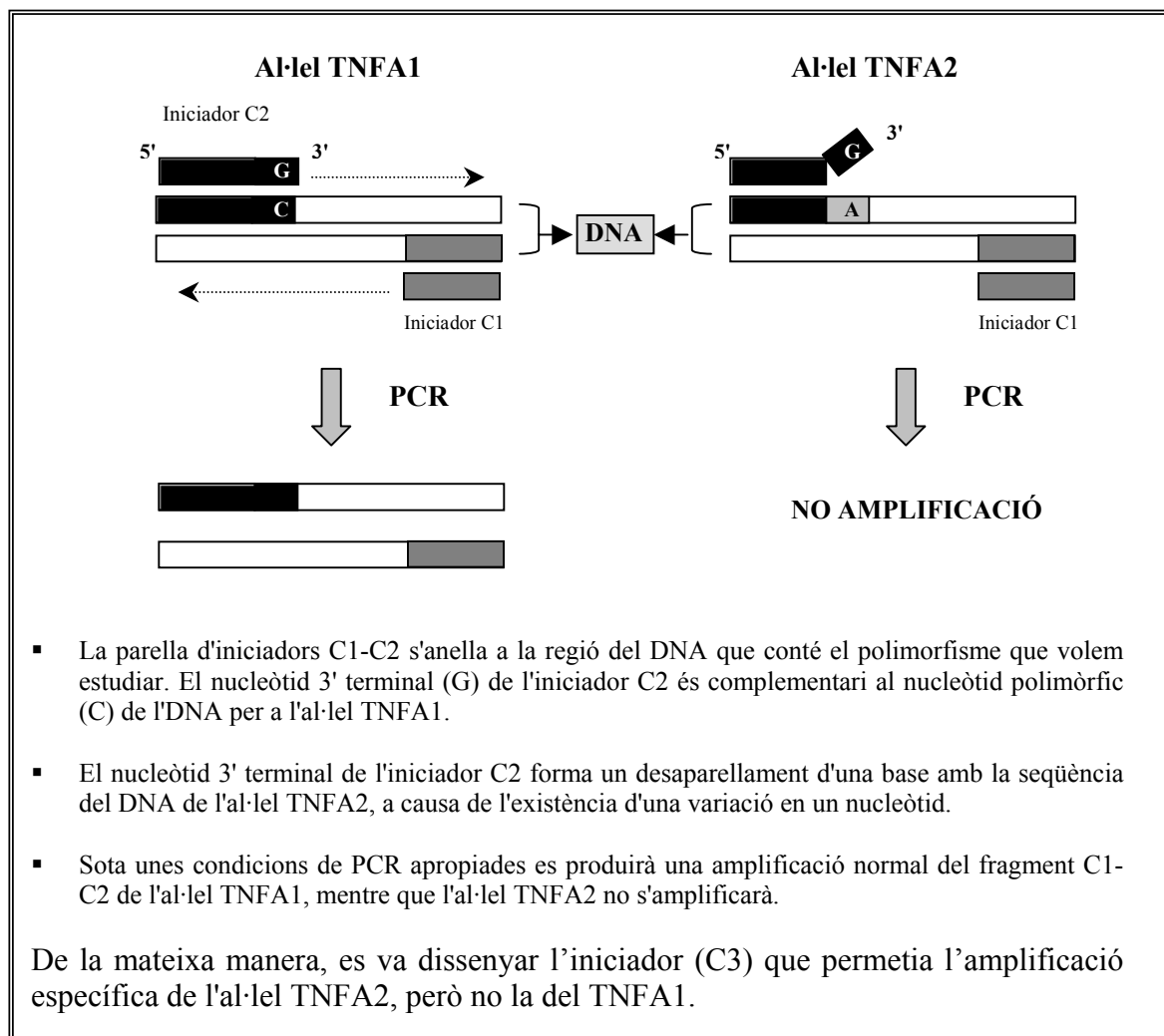
<b>C1</b> , iniciador 3'	posició -144/-164: <b>5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3'</b>
<b>C2</b> , iniciador 5' (complementari a l'al·lel TNF1)	posició -328/-308 <b>G</b> : <b>5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'</b>
<b>C3</b> , iniciador 5' (complementari a l'al·lel TNF2)	posició -328/-308 <b>A</b> : <b>5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'</b>

L'iniciador 3' C1 s'utilitza en combinació amb un dels dos iniciadors 5', C2 o C3, els quals sols difereixen en el nucleòtid 3' terminal. Quan el nucleòtid 3' de l'iniciador no s'uneix al DNA motlle no es produeix amplificació. Després d'alguns cicles d'amplificació, la formació d'un producte de PCR indica la presència de l'al·lel específic en el DNA motlle. Per a cada mostra de DNA es realitzen dues reaccions paral·leles: la parella d'iniciadors C1/C2 s'utilitza per a l'amplificació específica de l'al·lel TNFA1 i la parella C1/C3 per amplificar l'al·lel TNFA2. Com a control intern, tal com es descriu a l'apartat 7.7.4, es va dissenyar un estàndard que correspon a l'exó 1 del gen de la desmina flanquejat en l'extrem 5' per les mateixes seqüències que els iniciadors C2 i C3, i C1 en l'extrem 3'. Aquest DNA s'afegeix a cada reacció, i s'amplifica amb els mateixos iniciadors que la mostra estudiada (figura 7.3).

### 7.7.5.1. Condicions de la PCR

Per a l'amplificació es van utilitzar 100 ng de DNA genòmic en un volum final de 50 µl d'una solució de reacció que contenia: 0,5 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerasa, 250 µM de cada dNTP, 67 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,1% de Tween-20 (tots els reactius són de la casa Ecogen). A cada reacció es va afegir 1 pg del DNA estàndard.

Figura 7.3. Esquematització de la tècnica d'AS-PCR.



### 7.7.5.2. Cicles de la PCR

Les reaccions d'amplificació es van dur a terme en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Emerville, CA, EUA) sota les condicions següents:

1 cicle: - *desnaturalització*; 95°C, 5 min / *anellament*; 60°C, 1 min / *extensió*; 72°C, 1 min.

30 cicles: - *desnaturalització*; 95°C, 1,5 min / *anellament*; 60°C, 2,5 min / *extensió*; 72°C, 1 min.

1 cicle: - *extensió final*; 72°C, 7 min.

### 7.7.5.3. Visualització dels productes amplificats

Un cop finalitzada la PCR, els productes de la reacció es van analitzar mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa. Un volum de 10 µl de producte amplificat es carrega en un gel d'agarosa a l'1,5%/ TAE 1X. Per tal de comprovar que la mida dels productes corresponen al pes molecular esperat, a cada gel s'inclou un marcador de pes molecular (20 bp ladder, GenSura Inc). L'electroforesi es realitza a voltatge constant entre 80 i 90 V durant una hora aproximadament. A continuació els gels es tenyeixen amb una solució que conté bromur d'etidi (0,5 mg/ml) i les bandes dels productes visualitzades en un transil·luminador de llum ultraviolada.

### 7.7.6. Seqüenciació

La fiabilitat de l'AS-PCR es va comprovar mitjançant la seqüenciació del DNA en tres homozigots per a l'al·lel TNFA1, dos per a l'al·lel TNFA2 i tres heterozigots.

El procés realitzat va ser el següent:

1. Amplificació per PCR utilitzant DNA genòmic com a motlle.
2. Purificació enzimàtica dels productes amplificats.
3. Reacció de seqüenciació.
4. Purificació dels productes de la seqüenciació.

#### 7.7.6.1. Amplificació per PCR

Per a l'amplificació es van utilitzar 100 ng de DNA genòmic en un volum final de 50 µl d'una solució de reacció que contenia: 0,5 µM de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerasa, 250 µM de cada dNTP, 67 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,1% de Tween-20 (tots els reactius són de la casa Ecogen). Els iniciadors utilitzats per a la seqüenciació amplifiquen un fragment de DNA de 119 pb que contenia el polimorfisme -308 pb del gen del TNF-α (taula 7.5).

**Taula 7.5. Iniciadors utilitzats per a la seqüenciació.**

Iniciador 5':	<b>5'-CAAAAGAAATGGAGGCA-3'</b>
Iniciador 3':	<b>5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'</b>

*Els iniciadors van ser dissenyats al nostre laboratori i sintetitzats per ARK Scientific. La TM de cada iniciador es va calcular utilitzant el programa Oligo94 (v. 3.4, MedProbe).*

Les reaccions d'amplificació es van dur a terme en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Emerville, CA, USA) sota les següents condicions:

1 cicle: - *desnaturalització*; 95°C, 5 min / *anellament*; 60°C, 1 min / *extensió*; 72°C, 1 min.

30 cicles: - *desnaturalització*; 95°C, 1 min / *anellament*; 60°C, 1 min / *extensió*; 72°C, 1 min.

1 cicle: - *extensió final*; 72°C, 7 min.

#### **7.7.6.2. Purificació dels productes amplificats**

En la PCR s'utilitzen dos iniciadors, dNTP i DNA polimerasa a fi de produir múltiples còpies d'una seqüència de DNA específica. Quan l'amplificació acaba, els dNTP i els iniciadors que no s'han consumit poden interferir amb els mètodes de seqüenciació de DNA posteriors i, per tant, cal eliminar-los. En el nostre cas vam utilitzar el kit *PCR product Pre-Sequencing* (USB, Cleveland, Ohio, EUA). Aquest kit conté dos enzims hidrolítics: l'exonucleasa I, la qual degrada els iniciadors residuals i qualsevol DNA de cadena senzilla produït en la PCR, i la fosfatasa alcalina de gamba, que elimina els dNTP restants.

#### **Protocol:**

- Per cada 10 µl de producte de PCR s'afegeix 2 µl d'exonucleasa I (10 U/µl) i 2 µl de fosfatasa alcalina (2 U/µl).
- Es barreja i s'incuba a 37°C durant 45 minuts.
- S'inactiva l'exonucleasa I i la fosfatasa alcalina escalfant a 80°C durant 15 minuts.

#### **7.7.6.3. Reacció de seqüenciació**

Els productes purificats es van seqüenciar pel mètode de Maxam i Gilbert, utilitzant el kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready kit* (Applied Biosystems). Els primers utilitzats van ser els mateixos emprats en la PCR.

Les reaccions de seqüenciació es van dur a terme en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Emerville, CA, EUA) amb les condicions següents:

1 cicle: - *desnaturalització*; 95°C, 5 segons.

32 cicles: - *desnaturalització*; 96°C, 10 segons / *anellament*; 50°C, 5 segons / *extensió*; 60°C, 4 min.

#### 7.7.6.4. Purificació dels productes de la seqüenciació

Els productes de la seqüenciació contenen dideoxinucleòtids (ddNTP) marcats que no s'han incorporat a les cadenes de DNA sintetitzades. Aquests ddNTP sobrants poden interferir en la lectura de la fluorescència de les mostres, per la qual cosa cal eliminar-los mitjançant precipitació.

#### Protocol:

1. Es prepara 90 µl d'una solució que conté:
  - 3 µl d'acetat sòdic 3 M, pH = 4.6
  - 64,5 µl d'etanol del 95%
  - 24,5 µl d'H<sub>2</sub>O
2. S'afegeix els 90 µl de la solució als 10 µl del producte de seqüenciació.
3. S'agita suaument i es deixa precipitant durant 15 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
4. Es centrifugen els tubs a 14.000 rpm durant 30 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
5. Se'n descarta el sobrenedant.
6. S'hi afegeix 250 µl d'etanol al 70 %.
7. Es centrifuga a 14.000 rpm durant 5 minuts.
8. S'aspira el sobrenedant.
9. S'asseca el pellet durant 15 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
10. Es resuspèn el pellet amb 15 µl de TSR.
11. Es desnaturalitza a 94°C durant 4 minuts.
12. Es refreden els tubs ràpidament en gel.

Les mostres es van analitzar en un seqüenciador de DNA automàtic (ABI 310, Applied Biosystems).

#### 7.7.7. Tipificació del genotip HLA

La determinació de l'HLA s'ha fet per tècniques estàndard de DNA i s'ha realitzat al *North London Transfusion Centre* sota la direcció de la Dr. Cristina Navarrete.



## 7.8. Anàlisi estadística

Totes les dades clíniques i patològiques dels pacients, així com els resultats de les diferents determinacions que s'han anat obtenint durant el decurs del present estudi han estat recopilades i introduïdes en les corresponents bases de dades utilitzant el programa Microsoft® Access en el sistema operatiu Windows 97.

En la primera part d'aquesta tesi, els resultats s'han expressat com a medianes amb rangs. La comparació, entre els diferents grups de pacients, de les concentracions de TNF- $\alpha$  i dels receptors p55 i p75 solubles així com de membrana, es va fer utilitzant el test Mann-Whitney U per a variables no paramètriques. Aquest test es va aplicar després d'haver comprovat, utilitzant el test de Kolmogorov-Smirnov amb correcció de Lillieford, que les diferents variables no seguien una distribució normal.

L'anàlisi de correlació entre les diferents variables de l'estudi es va realitzar utilitzant l'Spearman's rank test.

A fi d'establir el llindar de les concentracions plasmàtiques de TNF- $\alpha$  i sTNFR-p55 i p75, es va determinar la sensibilitat, especificitat i es va calcular el valor predictiu positiu i negatiu per als diferents punts de tall, utilitzant per a aquests càlculs els valors obtinguts dels controls sans i dels nounats amb sèpsia i xoc sèptic. El valor predictiu positiu expressa la probabilitat que existeixi la malaltia considerant un resultat del test positiu. El valor predictiu negatiu es defineix com la probabilitat que un individu estigui lliure de la malaltia amb un resultat del test negatiu. El valor òptim del punt de tall ha de detectar tots els veritablement malalts amb un baix nombre de resultats positius falsos.

L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar amb el programa SPSS 8.0 per a Windows.

Els diferents càlculs i el tractament estadístic de les dades que s'ha utilitzat per a l'anàlisi del polimorfisme – 308 pb del gen del TNF- $\alpha$  es detalla a continuació:

## I. Càlcul de les freqüències genotípiques i al·lèliques

Les *freqüències genotípiques* (**f**) es van calcular com la ràtio entre el nombre d'individus que presentaven el genotip a estudiar (**n**) i la mida de la mostra (**N**):

$$f = n / N$$

Les *freqüències gèniques o al·lèliques* es van calcular segons les expressions següents:

$$p = ( AA + \frac{1}{2} Aa ) / n \quad q = ( aa + \frac{1}{2} Aa ) / n$$

sent **p** la freqüència gènica de l'al·lel **A** i **q** la de l'al·lel **a**; **AA**, el nombre d'individus homozigots per a l'al·lel **A**; **Aa**, el nombre d'heterozigots; **aa**, el nombre d'individus homozigots per a l'al·lel **a** i **n** la mida de la mostra.

## II. Equilibri de Hardy-Weinberg:

Aquests autors van establir que en una població panmíctica el suficientment gran i no sotmesa a mutacions, selecció ni migració, les freqüències dels genotips dels al·lells d'un locus qualsevol es mantenen constants d'una generació a la següent. En aquestes condicions, les freqüències gèniques determinen les freqüències genotípiques:

$$AA = p^2 \quad Aa = 2pq \quad aa = q^2$$

essent **p** i **q** les freqüències dels al·lells **A** i **a**, respectivament.

La comprovació que la distribució de les freqüències genotípiques s'ajustaven a l'equilibri de Hardy-Weinberg es va fer calculant les freqüències esperades de cada genotip i comparant-les amb els valors observats utilitzant el test de  $\chi^2$ .

## III. Anàlisi d'associació

Les freqüències al·lèliques i genotípiques en els grups de pacients es van comparar amb les del grup control utilitzant el test  $\chi^2$  amb correcció de Yates. El test de Fisher es va

utilitzar en els casos on les freqüències estimades eren inferiors a 5. L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar amb el programa SigmaStat<sup>®</sup> per a Windows.

A causa de les múltiples comparacions fetes en les anàlisis d'associació entre els al·lels del TNF- $\alpha$  amb l'HLA, els valors de  $P$  es van corregir multiplicant pel nombre de tests realitzats: 12 per a l'HLA-A, 18 per a l'HLA-B i 10 per a l'HLA de classe II.

El grau d'associació entre al·lels o d'un determinat al·lel amb la malaltia es va mesurar mitjançant l'anomenada oportunitat relativa (OR, *odds ratio*). L'OR es defineix com la probabilitat que un individu pugui desenvolupar una malaltia sent portador d'un al·lel determinat, comparada amb la probabilitat que això succeeixi si no és portador de l'esmentat al·lel:

$$\mathbf{OR} = n_1 \times n_4 / n_2 \times n_3$$

$n_1$ , és la proporció de pacients portadors de l'al·lel.

$n_2$ , és el nombre de controls portadors de l'al·lel.

$n_3$  i  $n_4$  són la proporció de pacients i controls respectivament, no portadors de l'al·lel.

*Quan l'OR = 1 indica que no hi ha cap associació amb la malaltia; quan l'OR és major o menor que 1 indica l'existència d'una associació positiva o negativa, respectivament.*

A fi d'avaluar quins eren els valors possibles de l'OR a la població i conèixer amb quina precisió s'ha estimat, es va calcular l'interval de confiança del 95% associat a cada OR:

$$OR_S = OR \times e^{+1,96 \times \text{var}(\ln OR)}$$

$$OR_I = OR \times e^{-1,96 \times \text{var}(\ln OR)}$$

On  $\text{var}(\ln OR) = 1/n_1 + 1/n_2 + 1/n_3 + 1/n_4$

*Si l'interval de confiança del 95% de l'OR inclou l'1, no es pot rebutjar la hipòtesi que l'OR de la població sigui 1.*

En tots els casos la significació estadística es va considerar a una  $P \leq 0,05$ .

*VIII*  
PART

---

**Bibliografia**

1. Abbas A, Snijders RJ, Buggins AG, Layton DM, Nicolaidis KH. 1993. Fetal plasma tumor necrosis factor concentration in normal pregnancy. *Fetal Diagn. Ther.* 8:220-223.
2. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, et al. 1995. Efficacy and safety of a monoclonal antibody to human tumor necrosis syndrome: a randomized, controlled, double blind, multicenter clinical trial. *JAMA (J Am Med Assoc)* 273:934-941.
3. Abraham E, Glauser MP, Butler T, Gardino J, Gelmont D, Laterre PF, Kudsk K, Bruining HA, Otto C, Tobin E, et al. 1997. p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 study group. *JAMA (J Am Med Assoc)* 277:1531-1538.
4. Abraham LJ, Chin Du D, Zahedi K, Dawkins RL, and Whitehead AS. 1991. Haplotypic polymorphisms of the TNF $\beta$  gene. *Immunogenetics* 33:50-53.
5. Adam-Klages S, Schwandner R, Adam D, Kreder D, Bernardo K, and Krönke M. 1998. Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J. Leukoc. Biol.* 63:678-682.
6. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, and Wallach D. 1992. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J. Exp. Med.* 175:323-329
7. Albertella MR, and Campbell RD. 1994. Characterization of a novel gene in the human major histocompatibility complex that encodes a potential new member of the I $\kappa$ B family of proteins. *Hum. Mol. Genet.* 3:793-99.
8. Alger LS, Lovchik JC, Hebel JR, Blackmon LR, and Crenshaw MC. 1988. The association of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and group B streptococci with preterm rupture of the membranes and pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159:397-404.
9. Almazán F, Montraveta M, Natal A, Coroleu W i Bel J. Evolució de la mortalitat neonatal i de les seves causes durant el període 1998-1999. VIII Reunió Anual de la Societat Catalana de Pediatria. Reus. Juny 2000.
10. Andrews W, Goldenberg RL, and Hauth J. 1995. Preterm labor: emerging role of genital tract infections. *Infect. Agens. Dis.* 4:196-211.
11. Anthony BF, Okada DM, and Hobel CJ. 1978. Epidemiology of group B streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J. Infect. Dis.* 137:524-530.
12. Arch RH, Gedrich RW, and Thompson CB. 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 12:2821-30.
13. Artal R, Burgeson R, Fernandez FJ, and Hobel CJ. 1979. Fetal and maternal copper levels in patients at term with and without premature rupture of membranes. *Obstet. Gynecol.* 53:608-10.
14. Ashkenazi A, and Dixit VM. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281:1305-8.
15. Ashkenazi A, Marsters SA, Capon DJ, Chamow SM, Figari IS, Pennica D, Goeddel DV, Palladino MA, and Smith DH. 1991. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535.
16. Austgulen R, Espevik T, Mecsei R, and Scott H. 1992a. Expression of receptors for tumor necrosis factor in human placenta at term. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 71:417-424.
17. Autsgulen R, Liabakk NB, Brockhaus M, and Espevik T. 1992b. Soluble TNF receptors in amniotic fluid and urine from pregnant women. *J. Reprod. Immunol.* 22:105-116.

18. Autsgulen R, Liabakk NB, Lien E, and Espevik T. 1993. Increased levels of soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptors in serum from pregnant women and in serum and urine samples from newborns. *Pediatr. Res.* 33:82-87.
19. Baeuerle PA. 1998. Pro-inflammatory signaling and modulation: Last pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle? *Curr. Biol.* 8:R19-R22.
20. Baldwin AS. 1996. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: New discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14:649-81.
21. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, and Lesslauer W. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF $\beta$  complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-45.
22. Barabas AP. 1966. Ehlers-Danlos syndrome: associated with prematurity and premature rupture of foetal membranes; possible increase in incidence. *BMJ.* 5515:682-4.
23. Barbara JA, Smith WB, Gamble JR, Van Ostade X, Vandenabeele P, Tavernier J, Fiers W, Vadas MA, and Lopez AF. 1994. Dissociation of TNF- $\alpha$  cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF- $\alpha$  mutants. *EMBO J.* 13:843.
24. Bazzoni F, Alejos E, and Beutler B. 1995. Chimeric tumor necrosis factor receptors with constitutive signaling activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5376-80.
25. Beutler B, Milsark IW, and Cerami A. 1985a. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229:869-71.
26. Beutler B, Milsark IW, and Cerami A. 1985b. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate in vivo. *J. Immunol.* 135:3972-3977.
27. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, and Cerami A. 1986a. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232:977-980.
28. Beutler B, and Cerami A. 1986b. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320:584-589
29. Beutler B and Cerami A. 1987. Cachectin: A monokine implicated as a mediator of cachexia and shock. *Lymphokines* 14:203-222.
30. Beutler B. 1990. Regulation of cachectin biosynthesis occurs at multiple levels. *Prog. Clin. Biol. Res.* 349:229-420.
31. Beutler B, and Brown T. 1991. A CAT reporter construct allows ultrasensitive estimation of TNF synthesis, and suggests that the TNF gene has been silenced in non-macrophage cell lines. *J. Clin. Invest.* 87:1336-1344.
32. Beutler B. 1995. TNF, immunity and inflammatory disease: Lessons of the past decade. *J. Invest. Med.* 43:227-235.
33. Black RA, Ruach CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, and Cerretti DP. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385:729-7352.
34. Bont ESJM, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WPF, Okken A, Leij LHF, and Kimpen JLL. 1994. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatr.* 83:696-699.
35. Bone RC. 1996. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response system: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit. Care Med.* 24:163-72.

36. Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM, D'Amaro J, de Vries RR, Kardjito T, and Ivanyi J. 1989. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis* specific antibody levels with HLA. *J. Infect. Dis.* 159:549-55.
37. Bouma G, Crusius JBA, Oudkerk PM, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kotsense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, and Peña AS. 1996. Secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha$  in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.* 43:456-463.
38. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, and Lemasters JJ. 1998. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol. Cell. Biol.* 18:6353-6364.
39. Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, and Rieckmann P. 1996. Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF- $\alpha$  production. *Neurosci. Lett.* 215:75-78.
40. Bry K, and Hallman M. 1993. Transforming growth factor- $\beta$ 2 prevents preterm delivery induced by interleukin-1  $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the rabbit. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168:1318-22.
41. Bryant-Greenwood GD, and Yamamoto SY. 1995. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172:63-70.
42. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convint J, and Blackwell JM. 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 182: 1259-1264.
43. Cairo M, Suen Y, Knoppel E, van de Ven C, Nguyen A, and Sender L. 1991. Decreased stimulated GM-CSF production and GM-CSF gene expression but normal numbers of GM-CSF receptors in human term newborns compared to adults. *Pediatr. Res.* 30:362-367.
44. Cairo M, Suen Y, Knoppel E, Dana R, Park L, Clark S, van de Ven C, and Sender L. 1992. Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. *Pediatr. Res.* 31:574-578.
45. Calandra T, Baumgartner JD, and Grau GE. 1990. Prognostic values of Tumor Necrosis Factor/Cachectin, Interleukin-1, Interferon-alpha, Interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. *J. Infect. Dis.* 161:982-987.
46. Calvano SE, van der Poll T, Coyle SM, Barie PS, Moldawer LL, and Lowry SF. 1996. Monocyte tumor necrosis factor receptor levels as a predictor of risk in human sepsis. *Arch. Surg.* 131:434-437.
47. Cameron PU, Mallal SA, French MAH, and Dawkins RL. Central MHC genes between HLA-B and complement C4 confer risk for HIV-1 disease progression. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T eds. *HLA 1991*. Vol 2. New York: Orford University Press; 1992. p. 544-47.
48. Candore G, Romano GC, D'Anna C, Di Lorenzo G, Gervasi F, Lio D, Modica MA, Potestio M, and Caruso C. 1998. Biological basis of the HLA-B8, DR3 associated progression of acquired immune deficiency virus syndrome. *Pathobiology* 33:33-37
49. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Schimer S, and Cerami A. 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1670-1674.
50. Carey JC, Klebanoff MA, Hauth JC, Hillier SL, Thom EA, Ernest JM, Heine RP, Nugent RP, Fischer ML, Leveno KJ, Wapner R, and Varner M. 2000. Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 342:534-40.

51. Carpenter A, Evans TJ, Buurman WA, Bemelmans MH, Moyes D, and Cohen J. 1995. Differences in the shedding of soluble TNF receptors between endotoxin-sensitive and endotoxin-resistant mice in response to lipopolysaccharide or live bacterial challenge. *J. Immunol.* 155:2005.
52. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, and Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3666-3670.
53. Caruso C, Candore G, Modica MA, Bonanno CT, Sireci G, Dieli F, and Salerno A. 1996. Major histocompatibility complex regulation of cytokine production. *J. Interferon Cytokine Res.* 16:983-988
54. Caruso C, Bongiardina C, Candore G, Cigna D, Colonna RG, Colucci AT, Di Lorenzo G, Gervasi F, Manno M, Polestio M, and Tantillo G. 1997. HLA-B8, DR3 haplotype affects lymphocyte blood levels. *Immunol. Invest.* 26:333-340
55. Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewich L, and MacDonald PC. 1989. Cachectin/tumour necrosis factor- $\alpha$  formation in human decidua: potencial role of cytokines in infection-induced preterm labour. *J. Clin. Invest.* 83:430-6.
56. Casey LC, Balk RA, Bone RC. 1993. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Int. Med.* 119:771-78.
57. Cassell G, Hauth J, Andrews W, Cutter G and Goldenberg R. 1993. Chorioamnion colonization: correlation with gestational age in women delivered following spontaneous labor versus indicated delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168:425. Abstract.
58. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, and Piazza A. The history and geography of human genes. Princeton: Princeton University Press, 1994.
59. Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL, Wong GY, Kempin SJ, Gold PJ, Welt S, Warren RS, Starnes HF, Sherwin SA, Old LJ, and Oettgen HF. 1987. Clinical pharmacology of recombinant tumour necrosis factor in patients with advanced cancer. *J. Clin. Onco.* 5:1942-51.
60. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, and Wegmann TG. 1990. Control of fetal survival in CBAXDBA/2 mice by lymphokine therapy. *J. Reprod. Fertil.* 89:447-458.
61. Chard T. 1995. Cytokines in implantation. *Hum. Reprod. Update.* 1:385-396.
62. Chen C, Yen JH, Tsai WC, Wu CS, Chiang W, Tsai JJ, and Liu HW. 1997. The TNF2 allele does not contribute towards susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Immunol. Lett.* 55:1-3.
63. Christiansen FF, Zhang WJ, Griffiths M, Mallal SA, and Dawkins RL. 1991. Major histocompatibility complex (MHC) complement deficiency, ancestral haplotypes and systemic lupus erythematosus (SLE): C4 deficiency explains some but not all of the influence of the MHC. *J. Rheumatol.* 18:1350-58.
64. Clauss M, Ryan J, and Stern D. 1992. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by TNF: Insights into the role of endothelium in the host response to inflammatory stimuli. In: *Tumor necrosis factor: The molecules and their emerging role in medicine.* Beutler B (Ed). New York, Raven Press, pp49-63.
65. Clem RJ and Duckett CS. 1997. The *iap* genes: Unique arbitrators of cell death. *Trends Cell. Biol.* 7:337-339.
66. Collins FM. 1978. Cellular antimicrobial immunity. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 7:27-29.
67. Comas D, Mateu E, Calafell F, Pérez-Lezaun A, Bosch E, Martínez-Arias R, and Bertranpetit J. 1998. HLA class I and class II DNA typing and the origin of Basques. *Tissue Antigens* 51:30-40.
68. Comstock GW. 1978. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117:621-24.



69. Conway DJ, Holland MJ, Bailey RL, Campbell AE, Mahdi OS, Jennings R, Mbena E, and Mabey DC. 1997. Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene promoter and with elevated TNF alpha levels in tear fluid. *Infect. Immun.* 65:1003-6.
70. Cory S. 1998. Cell death throes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12077-79.
71. Crowe PD, Walker BN, Mohler KM, Otten-Evans C, Black RA, and Ware CF. 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181:1205.
72. Cuturi MC, Murphy MP, Costa-Gioni R, Weinmann R, Perussia B, and Trinchieri G. 1987. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165:1581-1594.
73. D'Alfonso, Cappello N, Borelli I, Mazzola G, Peruccio D, Giordano M, Cascino I, Tosi R, and Richiardi PM. 1994. HLA supratypes in an Italian population. *Immunogenetics* 39:114-20.
74. Dantzker DR, Foresman B, and Gutierrez G. 1991. Oxygen supply and utilization relationships. A reevaluation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:675-9.
75. Da Silva JA and Spector TD. 1992. The role of pregnancy in the course and aetiology of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 11:189-194.
76. Dawkins R, Leelayuwat C, Gandieri S, Tay G, Hui J, Cattley S, Martínez P, and Kulski J. 1999. Genomics of the major histocompatibility complex: Haplotype, duplications, retroviruses and disease. *Immunol. Rev.* 167:275-304
77. Dayer J-M, Beutler B, and Cerami A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor (TNF) stimulates collagenase and PGE2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med* 162:2163-68.
78. Declercq W, Denecker G, Fiers W, and Vandenaabeele P. 1998. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: Involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J. Immunol.* 161:390-399.
79. Degli-Esposti MA, Leaver AL, Christiansen FT, Witt CS, Abraham LJ, and Dawkins RL. 1992a. Ancestral haplotypes: Conserved population MHC haplotypes. *Hum. Immunol.* 34:242-52.
80. Degli-Esposti MA, Leelayuwat C, and Dawkins RL. 1992b. Ancestral haplotypes carry haplotypic and haplospecific polymorphisms of BAT1: Possible relevance to autoimmune disease. *Eur. J. Immunogenet.* 19:121-27.
81. Degli-Esposti MA, Abraham LJ, McCann V, Spies T, Christiansen FT, and Dawkins RL. 1992c. Ancestral haplotypes reveal the role of the central MHC in the immunogenetics of IDDM. *Immunogenetics* 36:345-56.
82. Demeter J, Porzolt F, Rämisch, Schmidt D, Schimid M, and Messer G. 1997. Polymorphism of the tumor necrosis factor- $\alpha$  and lymphotoxin- $\alpha$  genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 97:107-112.
83. Devery JM, King MJ, and Geczy CL. 1994. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils *in vivo* and *in vitro*. *J. Immunol.* 152:1888-1897.
84. Dizon-Townson D, Major H, Varner M, and Ward K. 1997. A promoter mutation that increases transcription of the tumor factor- $\alpha$  gene is not associated with preterm delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177:810-3.
85. Draper D, McGregor J, and Hall J. 1995. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173:1506-12.

86. Duan R and Dixit VM. 1997. RAIDD is a new "death" adaptor molecule. *Nature* 385:86-89.
87. Dudley D. 1999. Immunoendocrinology of preterm labor: The link between corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180:S251-256.
88. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, and Varner MW. 1994. Clinical value of amniotic fluid interleukin-6 determinations in the management of preterm labor. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 101:592-7.
89. Eder J. 1997. Tumour necrosis factor and interleukin 1 signaling: Do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol. Sci.* 18:319-22.
90. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, Ueffing M, Scheurich P, Hieke A, Multnoff G, Bornkamn GW, and Holler E. 1995. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 86:4184-4193
91. Elder HA, Santamarina BAG, Smith S, and Kass EH. 1971. The natural history of asymptomatic bacteriuria during pregnancy: the effect of tetracycline on the clinical course and the outcome of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 111:441-62.
92. Endo S, Inada K, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, and Yoshida M. 1992. Two types of septic shock classified by the plasma level of cytokines and endotoxin. *Circulatory Shock* 38L:264-74
93. Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, and Moore MW. 1994. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF-receptor-2-deficient mice. *Nature* 372:560.
94. Ertel W, Scholl FA, Gallati H, Bonaccio M, Schildberg FW, and Trentz O. 1994. Increased release of soluble tumor necrosis factor receptors into blood during clinical sepsis. *Arch. Surg.* 129:1330-1337.
95. Fidel PL, Romero R, Wolf N, Cutright J, Ramirez M, Araneda H, and Cotton DB. 1994. Systemic and local cytokine profiles in endotoxin-induced preterm parturition in mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170:1467-75.
96. Fiers W. 1991. Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* 285:199-212.
97. Fine PE. 1981. Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis, and leishmaniasis. An epidemiological perspective. *Int. J. Leprosy & Other Mycobacterial Dis.* 49:437-54.
98. Fischer CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, and Benjamin E. 1996. Treatment of septic shock with tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. The soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 334:1697-1702.
99. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo C, Allison AC, Lowry SF, and Cerami A. 1989. Antibodies to cachectin/tumour necrosis factor reduces interleukin-1 $\beta$  and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J. Exp. Med.* 170:1627-33.
100. Fortunato SJ, Menon R, and Lombardi SJ. 2000. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182:1468-76.
101. Fortunato SJ and Menon R. 2001a. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184:1399-406.
102. Fortunato SJ, Menon R, and Lombardi SJ. 2001b. Support for an infection-induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184:1392-8.
103. Fredman RM, Ingram DL, and Gross I. 1981. A half century of neonatal sepsis at Yale. *Am. J. Dis. Child.* 135:140-144.

104. Gamble WB, Smith MA, and Vadas MA. TNF modulation of endothelial and neurophil adhesion. In: Tumor necrosis factor: The molecules and their emerging role in medicine. Beutler B (Ed). New York, Raven Press, 1992, pp65-86.
105. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, and Nakanishi Y. 1996. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* 75:224-8
106. Garite TJ, and Freeman RK. 1982. Chorioamnionitis in preterm gestation. *Obstet. Gynecol.* 59:539-545.
107. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, and Sweet RL. 1992. A review of premature birth and subclinical infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166: 1515-28.
108. Gibbs RS, and Eschenbach DA. 1997. Use of antibiotics to prevent preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 177:375-80.
109. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, and Dayer JM. 1992. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. *Immunology.* 76:20-23.
110. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, and Baltimore RS. 1990. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr. Infect. Dis. J* 9:819-825.
111. Gomez R, Romero R, Edwin SS, and David C. 1997. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11:135-76.
112. Goossens V, Grooten J, De Vos K, and Fiers W. 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8115-8119.
113. Gravett MG, Hummel D, Eschenbach DA, and Holmes KK. 1986. Preterm labor associated with subclinical amniotic fluid infection with bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 67:229-37.
114. Greenberg M, and Belasco JG. In Belasco JG and Brawerman G (eds). *Control of Messenger RNA Stability.* Academic Press, San Diego, CA, 1993, pp. 199-218.
115. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, and Scheurich P. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802.
116. Grupo Castrillo. Resultados del estudio colaborativo multicéntrico de la S.E.N. En: *Infección neonatal. Memoria 1996-97 de la SEN Ed. Mediprint; 1997:17-43.*
117. Guzik DS, and Winn K. 1985. The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet. Gynecol.* 65:11-16.
118. Haimovici F, Hill JA and Anderson DJ. 1991. The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol. Reprod.* 44:69-75.
119. Haimovici F and Anderson DJ. 1993. Cytokines and growth factors in implantation. *Microsc. Res. Tech.* 25:201-207.
120. Han J, Brown T, and Beutler B. 1990. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J. Exp. Med.* 171:465-475.
121. Hanifi Moghaddam P, de Knijf P, Roep BO, Van der Auwera B, Naipal A, Gorus F, Schuit F, and Giphart MJ. 1998. Genetic structure of IDDM1: Two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility or protection. *Diabetes* 47:263-69.

122. Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. 1994. *J. Biol. Chem.* 269:3125-3128.
123. Haridas V, Darnay BG, Natarajan K, Heller R, and Aggarwal BB. 1998. Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor- $\kappa$ B activation, and c-Jun kinase activation. *J. Immunol.* 160:3152-62.
124. Harris MC, Costarino AT, Sullivan JS, Dulkerian S, McCawley L, Corcoran L, Butler S, and Kilpatrick L. 1994. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.* 124:105-111.
125. Hauth JC, Goldenberg RL, Andrews WW, DuBard MB, and Copper RL. 1995. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 333:1732-6.
126. Heddleston L, McDuffic RS, and Gibbs RS. 1993. A rabbit model for ascending infection in pregnancy: intervention with indomethacin and delayed ampicillin-sulbactam therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169:708-12.
127. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, and Cambien F. 1998. Polymorphism of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene, coronary heart disease and obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* 28:59-66.
128. Hill AVS, Allsopp CE, Kwiatkovski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, and Greenwood BM. 1991. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352:595-600.
129. Hill JA. 1991. Cellular and molecular biology of the maternal-fetal relationship (Chaouat G and Mowbray JF eds) pp. 269-275.
130. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, and Eschenbach DA. 1988. A case controlled study and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N. Engl. J. Med.* 319:972-978.
131. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, and Eschenbach DA. 1993. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnionitis infection. *Obstet. Gynecol.* 81:941-8.
132. Hillier SL, Krohn MA, Cassen E, Easterling TR, Rabe LK, and Eschenbach DA. 1994. The role of bacterial vaginosis and vaginal bacteria in amniotic fluid infection in women in preterm labor with intact fetal membranes. *Clin. Infect. Dis.* 20:Suppl 2:S276-S278.
133. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, Cotch MF, Edelman R, Pastorek JG, and Rao AV. 1995. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *N. Engl. J. Med.* 333:1737-42
134. Hinshaw LB. 1996. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit. Care. Med.* 24:1072-78.
135. Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Meyer KH, and Rittner C. 1997. HLA-DRB1\*1301 and \*1302 protect against chronic hepatitis. *B. J. Hepatol* 26:503-7.
136. Holst E, Goffeng AR, and Andersch B. 1994. Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. *J. Clin. Microbiol.* 32:176-86.
137. Horvath CJ, Ferro TJ, Jesmok G, and Malik AB. 1988. Recombinant tumor necrosis factor increases pulmonary vascular permeability independent of neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9219-23.
138. Hsu H, Shu H-B, Pan M-G, and Goeddel DV. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.

139. Hunt JS. 1996. Functional aspects of the tumor necrosis factor gene family in pregnancy. In Proceedings of the 13<sup>th</sup> Rochester Trophoblast Conference. Banff, Canada. Banff Conferences Publishing. Banff, Alberta, Canada, abstr. 38.
140. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, and Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: HLA 1991, Vol 1 (ed. K Tsuji, M Aizawa and T Sasazuki), p. 1065. Oxford University Press, New York.
141. Inohara N, del Peso L, Koseki T, Chen S, and Núñez G. 1998. RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273:12296-12300.
142. Itescu S, Mathur WU, Skovron ML, Brancato LJ, Marmor M, Zeleniuch JA, and Winchester R. 1992. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J. AIDS.* 5:37-45.
143. Jarvis JN, Deng L, Berry SM, Romero R, and Moore H. 1995. Fetal cytokine expression in utero detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatr. Res.* 37:450-454.
144. Jepson A, Banya W, Sisay Joof F, Hasan KM, Nunes C, Bennett S, and Whittle HC. 1997. Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes to human immune responses to foreign antigens. *Infect. Immun.* 65:872-76.
145. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, and Goeddel DV. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283:543-46.
146. Johnson J, Meyrick B, Jesmok G, and Brigham KL. 1989. Human recombinant tumour necrosis factor  $\alpha$  induction mimics endotoxemia in awake sheep. *J. Appl. Phy.* 66:1448-1454.
147. Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, and Cambon-Thomsen A. 1991. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9717-9721.
148. Karin M, Liu Z-G, and Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-46.
149. Kaslow RA, Duquesnoy R, van Raden M, Kingsley L, Marrari M, Friedman H, Su S, Saah AJ, Detels R, and Phair J. 1990. A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Lancet* 335:927-30.
150. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, and Mann DL. 1996. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2:405-11.
151. Keelan JA, Coleman M, and Mitchell MD. 1997. The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications. *Clin. Obstet. Gynecol.* 40:460-78.
152. Kok CC, Croager ES, Witt CS, Kiers L, Mastaglia FL, Abraham LJ, and Garlepp MJ. 1999. Mapping of a candidate region for susceptibility to inclusion body myositis in the human major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 49:508-516.
153. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, and Lu SD. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53:45-53.
154. Kroeger KM, Carvelle KS, and Abraham LJ. 1997. The -308 tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter polymorphism affects transcription. *Mol. Immunol.* 34:391-399.
155. Kruys V, Marinx O, Shaw G, Deschamps J, and Huez G. 1989. Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 245:852-854.

156. Kuida K, Haydar TF, Kuan C, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS-S, Rakic P, and Flavell RA. 1998. Reduced apoptosis and cytochrom c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94:325-337.
157. Kunkel SL, Remick DG, Strieter RM, and Larrick JW. 1989. Mechanisms that regulate the production and effects of tumor necrosis factor alpha. *Crit. Rev. Immunol.* 9:93-117
158. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, and Beer AE. 1995. Up-regulated expression of CD56<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, and CD19<sup>+</sup> cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:93-99.
159. Laham N, Brennecke SP, Bendtzen K, and Rice GE. 1994. Tumour necrosis factor  $\alpha$  during human pregnancy and labour: maternal plasma and amniotic fluid concentrations and release from intrauterine tissues. *Eur. J. Endocrinol.* 131:607-14
160. Larrick JW, and Kunkel SL. 1988. The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. *Pharm. Res.* 5:129-139
161. Lavery JP, Miller CE, and Knight RD. 1982. The effect of labor on the rheologic response of chorioamniotic membranes. *Obstet. Gynecol.* 60:87-92.
162. Lee SM, Knoppel E, van de Ven C, and Cairo MS. 1993. Transcriptional rates of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3, and Macrophage Colony-Stimulating Factor genes in activated cord versus adult mononuclear cells: Alteration in cytokine expression may be secondary to posttranscriptional instability. *Pediatr. Res.* 34:560-564.
163. Lei H, Furth EE, and Kalluri R. 1996. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J. Clin. Invest.* 98:1971-8.
164. Lenzi M, Frisoni M, Mantovani V, Ricci P, Muratoni L, Francesconi R, Cuccia M, Ferri S, and Bianchi FB. 1998. Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 91:2062-66.
165. Leppert PC, Takamoto N, and Yu SY. 1996. Apoptosis in fetal membranes may predispose them to rupture. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 3:128.
166. Lesslauer W, Tabuchi H, Gentz R, Brockhaus M, Schlaeger EJ, Grau G, Piguet PF, Pointaire P, Vassalli P, and Loetscher H. 1991. Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality. *Eur. J. Immunol.* 21:2883.
167. Lewis M, Tartaglia LA, Lee A Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, and Goeddel DV. 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2830-2834.
168. Lin X, Mu Y, Cunningham ET, Marcu KB, Geleziunas R, and Greene WC. 1998. Molecular determinants of NF- $\kappa$ B-inducing kinase action. *Mol. Cell. Biol.* 18:5899-5907.
169. Lio D, Candore G, Colombo A, Romano GC, Gervasi F, Marino V, Scola L, and Caruso C. 2001. A genetically determined high setting of TNF- $\alpha$  influences immunologic parameters of HLA-B8, DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. *Hum. Immunol.* 62:705-13.
170. Loetscher H, Pan Y-C, Lham H-W, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, and Lesslauer W. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 Kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61:351
171. Loke H, Bethell D, Day N, White NJ, and Hill AVS. 1996. A TNF promoter variant, HLA and dengue in Vietnam. *Hum. Immunology* 47:680.
172. López Sastre JB, Coto Collado GD, Fernández Colomer B. Sepsis de transmisión vertical. *An. Esp. Pediatr.* 1997, supl 97: 63-66.

173. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, and Belaiche J. 1998. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin. Exp. Immunol.* 113:401-406.
174. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, and Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
175. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, and Macvicar J. 1993. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 14:385-406.
176. Malack TM, and Bell SC. 1994. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 101:375-86.
177. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, and Wallach D. 1997. MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540-44.
178. Martin C, Sauzax P, Mege JL, Perrin G, Papazian L, and Gouin F. 1994. Prognostic values of serum cytokines in septic shock. *Int. Carre. Med.* 20:272-77.
179. Matchison JC, Wolfson E, and Ulevitch R. 1988. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J. Clin. Invest.* 81:1925-1937.
180. Mathers NJ, and Pohlandt F. 1987. Diagnostic audit of c-reactive protein in neonatal infection. *Eur. J. Pediatr.* 146:147-151.
181. Mathews M. 1981. Tumor necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis in vitro by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits. *Br. J. Cancer* 44:418-424.
182. Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Yoon BH, Gomez R, and Romero R. 1999. The tumor necrosis factor  $\alpha$  and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181:1142-1148.
183. McCarthy JV, Ni J, and Dixit VM. 1998. RIP2 is a novel NF- $\kappa$ B-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 273:16968-16975.
184. McGregor JA, French JI, Lawellin D, Franco-Buff A, Smith C, and Todd JK. 1987. Bacterial protease-induced reduction of chorioamniotic membrane strength and elasticity. *Obstet. Gynecol.* 69:167-74.
185. McGregor JA. 1988. Prevention of preterm birth: new initiatives based on microbial-host interactions. *Obstet. Gynecol. Surv.* 43:1-14.
186. McGregor JA, French JI, and Parker R. 1995. Prevention of premature birth by screening and treatment for common genital tract infections: results of a prospective controlled evaluation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173:157-67.
187. McGuire W, Hill AV, Allsoff CE, Greenwood BM, and Kwiatkowski D. 1994. Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371:508-11.
188. McManus R, Wilson AG, Mansfield J, Weir DG, Duff GW, and Kelleher D. 1996. TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis- $\alpha$  gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. *Eur. J. Immunol.* 26:2113-18.
189. Meis PJ, Goldenberg RL, Mecer B, Moawad A, Das A, McNellis D, Johnson F, Iams JD, Thom E, and Andrews WW. 1995. The Preterm Prediction Study: significance of vaginal infections. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173:1231-5.
190. Mercer BM, Miodovnik M, Thurnau GR, Goldenberg RL, Das AF, Ramsey RD, Rabello YA, Meis PJ, Moawad AH, Iams JD, Van Dorsten JP, Paul RH, Bottoms SF, Merenstein G, Thom EA, Roberts JM,

- and McNellis. 1997. Antibiotic therapy for reduction of infant morbidity after preterm premature rupture of the membranes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 278:989-95.
191. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, and Wilmore DW. 1988. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.* 318:1481-1486.
  192. Milner CM, and Campbell RD. 1993. The G9a gene in the human major histocompatibility complex encodes a novel protein containing ankyrin-like repeats. *Biochem. J.* 290:811-18.
  193. Milner CM, Smith SV, Carrillo MB, Taylor GL, Hollinshead M, and Campbell RD. 1997. Identification of a sialidase encoded in the human major histocompatibility complex. *J. Biol. Chem.* 272:4549-58.
  194. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, and Dhainaut JF. 1999. Association of TNF2, a TNF- $\alpha$  promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 282:561-568.
  195. Mitchell MD, Romero R, Edwin SS, and Trautman MS. 1995. Prostaglandins and parturition. In: *Progress in perinatal physiology*. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:469-77.
  196. Moffatt MF, and Cookson WO. 1997. Tumor necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum. Mol. Genet.* 6:551-54.
  197. Morales WJ. 1987. The effect of chorioamnionitis on the developmental outcome of the preterm infants at one year. *Obstet. Gynecol.* 70:183-186.
  198. Moss ML, Catherine-Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkkart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, and Becherer JD. 1997. Cloning of disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 385:733-736.
  199. Nadel S, Newport MJ, Booy R, and Levin M. 1996. Variation in the tumor necrosis factor alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* 174:878-80.
  200. Nedospasov SA, Udalova IA, Kuprash DV, and Turetskaya RL. 1991. DNA sequence polymorphism at the human necrosis factor (TNF) locus. *J. Immunol.* 147:1053-59.
  201. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong RPO, and Cheung KL. 1997. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and c-reactive protein in preterm very low birth weight infants. *Arch. Dis. Child.* 77:F221-F227.
  202. Norman K, Pattinson RC, de Souza J, de Jong P, Moller G, and Kirsten G. 1994. Ampicillin and metronidazole treatment in preterm labour: a multicentre, randomised controlled trial. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 101:404-8.
  203. Olenchock SA, Heise ER, Marx JJ, Mentnech MS, Mull JC, Spurgeon DE, Hancock JS, Elliott JA, Pearson DJ, Price CD, and Major PC. 1981. HLA-B8 in sarcoidosis. *Ann. Allergy* 47:151-53.
  204. Özdemir A, Oygür N, Gültekin M, Çoskun M, Yegin O. 1994. Neonatal tumor necrosis factor, interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 response to infection. *Am. J. Perinatol.* 11:282-285.
  205. Parham P. 1999. Virtual reality in the MHC. *Immunol. Rev.* 167: 5-15.
  206. Peano G, Menardi G, Ponzetto A, and Fenoglio LM. 1994. HLA DR5 antigen. A genetic factor influencing the outcome of hepatitis C virus infection? *Arch. Intern. Med.* 154:2733-36.



207. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, and Goeddel DV. 1984. Human tumour necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.
208. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccun MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrisey PJ, Ware CB, and Mohler KM. 1998. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J. Immunol.* 160:943-952.
209. Pfeffer K, Matsuyama T, Künding TM, Wakerham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, and Mak TW. 1993. Mice deficient for the 55 Kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. Monocytogenes infection. *Cell* 73:457.
210. Pinsky MR, Vicent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, and Dupont E. 1993. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 103:565-75.
211. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölving J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, and Cambon-Thomsen A. 1993. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF $\alpha$  and TNF $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent mellitus. *Eur. J. Immunol.* 23:224-231.
212. Quezado ZM, and Natanson C. 1992. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. *Am. J. Kidney Dis.* 20:214-22.
213. Rangel-Frausto MS, Pitter D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, and Wenzel RP. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *Journal of the American Medical Association* 11:117-123.
214. Rani R, Fernandez MA, Zaheer SA, Beena KR, and Stastny P. 1993. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens* 42:133-37.
215. Raghupathy R. 1997. Th1-type immunity is compatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 18:478-482.
216. Redl H, Schlag G, Ceska M, Davies J, and Buurman WA. 1993. Interleukin-8 release in baboon septicemia is partially dependent on tumour necrosis factor. *J. Infect. Dis.* 167:1464-66.
217. Reed JC. 1997. Cytochrome c: Can't live with it – Can't live without it. *Cell* 91:559-562.
218. Regan JA, Chao S, and James LS. 1981. Premature rupture of membranes, preterm delivery, and group B streptococcal colonization of mothers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141:184-6.
219. Roberts A, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin P, Holder J, Macones GA, Morgan MA, Strauss JF, and Parry S. 1999. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180:1297-302.
220. Robinson MJ and Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:180-186.
221. Roman J, Fernandez F, Velasco F, Rojas R, Roldan MR, and Torres A. 1993. Serum TNF levels in neonatal sepsis and septic shock. *Acta Paediatr.* 82:352-354.
222. Romero R, and Mazor M. 1988. Infection and preterm labor. *Clin. Obstet. Gynecol.* 31:553-84.
223. Romero R, Sirtoli M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, Sabo V, Athanassiadis AP, and Hobbins JC. 1989a. Infection and labor V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161:817-824.

224. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, and Cerami A. 1989b. Infection and labor IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161:336-41.
225. Romero R, Salafia CM, Athanassiadis AP, Hanaoka S, Mazor M, Sepulveda W, and Bracken MB. 1992a. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166:1382-88.
226. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, and Williams J. 1992b. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166:1576-87.
227. Rothe J, Lesslauer W, Loetscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, and Bluethmann H. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364:798.
228. Rothe M, Pan M-G, Henzel WJ, Ayres TM, and Goeddel DV. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis. *Cell* 83: 1243-1252.
229. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CGN, Saha B, Hazra SK, Hill AVS, and Kwiatkowski D. 1997. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.* 176:530-32.
230. Salvesen GS and Dixit VM. 1997. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
231. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, Sinnott PJ, and Hutchinson IV. 1999. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int.* 56:281-288.
232. Santana P, Peña LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, and Kolesnick R. 1996. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86:189-199.
233. Sato N, Goto T, Haranaka K, Satomi N, Nariuchi H, Mano-Hirano Y, and Sawasaki Y. 1986. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: Morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J. Natl. Cancer. Inst.* 76:1113-21.
234. Schall T, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong G, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, Kohr WJ, and Goeddel DV. 1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61:361.
235. Schievella AR, Chen JH, Graham JR, and Lin L-L. 1997. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272:12069-75.
236. Shalaby MR, Sundan A, Loetscher H, Brockhaus M, Lesslauer W, and Espevik T. 1990. Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptor. *J. Exp. Med.* 172:1517.
237. Sheehan K, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, and Schreiber RD. 1995. Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J. Exp. Med.* 181:607.
238. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei III, and Kufe DW. 1988. Recombinant human tumour necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: Phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J. Clin. Oncol.* 6:344-50.
239. Sherry B, and Cerami A. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J. Cell. Biol.* 107:1269-1277.

240. Shi C-S, and Kehrl JH. 1997. Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, but not NF- $\kappa$ B, by the tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 through a TNF receptor-associated factor 2 and germinal centre kinase related-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272:32102-32107.
241. Shu H-B, Takeuchi M, and Goeddel DV. 1996. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13973-13978.
242. Silveira RC, and Procionoy RS. 1999. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 88:647-650.
243. Sitja N, Natal A, López-Núñez A, Luna MA y Asensio AM. Importancia de la antibioticoterapia en las gestantes portadoras de estreptococo grupo B. XVIII Congreso Español de Medicina Perinatal. Barcelona 2001.
244. Sjoberg K, Lepers JP, Raharimalala L, Larsson A, Olerup O, Marbiah NT, Troye BM, and Perlmann P. 1992. Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2101-4.
245. Smith C, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, and Goodwin RG. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019.
246. So T, Ito A, Sato T, Mori Y, and Hirakawa S. 1992. Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol. Reprod.* 46:772-8.
247. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, and Teasdale TW. 1988. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N. Engl. J. Med.* 318:727-32.
248. Souba WW. 1994. Cytokine control of nutrition and metabolism in critical illness. *Curr. Probl. Surg.* 31:577-643.
249. Steinborn A, von Gall C, Hildenbrand R, Stutte HJ, and Kaufmann M. 1998a. Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet. Gynecol.* 91:329-35.
250. Steinborn A, Geisse M, Kauffmann M. 1998b. Expression of cytokine receptors in the placenta in term and preterm labour. *Placenta.* 19:165-170.
251. Strieter RM, Kunkel SL, and Bone RC. 1993. Role of tumour necrosis factor-alpha in disease state and inflammation. *Crit. Care Med.* 21:S447-463.
252. Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schade FU, and Nedospasov SA. 1995. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J. Inflammation* 46:42-50.
253. Sung SJ, Bjorndahl JM, Wang CY, Kao HT, and Fu SM. 1988. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *J. Exp. Med.* 167:937-953.
254. Suto R, and Srivastava PK. 1995. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269:1585-1588.
255. Svare J, Langhoff-Roos J, Anderson LF, Kryger-Baggesen N, Borch-Christensen H, Heisterberg L, and Kristensen J. 1997. Ampicillin-metronidazole treatment in idiopathic preterm labour: a randomised controlled multicentre trial. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104:892-7.

256. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, and Palladino MA. 1993a. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* 151:4637.
257. Tartaglia LA, Pennica D, and Goeddel DV. 1993b. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 268:18542.
258. Tartakovsky B, and Ben-Yair E. Cytokines modulate preimplantation development and pregnancy. *Dev. Biol.* 1991; 146:345.
259. Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer J-L, Mattmann C, and Tschopp J. 1998. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr. Biol.* 8:885-888.
260. Thursz M, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, and Hill AVS. 1995. Association of an HLA class II allele with clearance of hepatitis B virus infection in The Gambia. *N. Engl. J. Med.* 332:1065-69.
261. Tjugum J, and Norstrom A. 1985. The influence of prostaglandin E2 and oxytocin on the incorporation of [<sup>3</sup>H] proline and [<sup>3</sup>H] glucosamide in the human amnion. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 19:137-43.
262. Tracey KJ, Fong JY, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, and Cerami A. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330:662-64.
263. Tracey KJ, Lowry SF, and Cerami A. 1988. Cachectin/TNF in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:1377-1379.
264. Tracey KJ, Vlassara H, and Cerami A. 1989. Cachectin/Tumour Necrosis factor. *Lancet* 1:1122-1126.
265. Tsuji K, Aizawa M, and Sasazuki T. HLA 1991. Oxford: Oxford University Press, 1992.
266. Turner DM, Grant SCD, Lamb WR, Brenchley PE, Dyer PA, Sinnott PJ, and Hutchinson IV. 1995. A genetic marker of high TNF- $\alpha$  production in heart transplant recipients. *Transplantation* 60:1113-1117.
267. Turner DM, Grant SCD, Yonan N, Sheldon S, Dyer PA, Sinnott PJ, and Hutchinson IV. 1997. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 64:776-783.
268. Udalova IA, Nedospasov SA, Wegg GC, Chaplin DD, and Turetskaya RL. 1993. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* 16:180-186.
269. Ugliarolo AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, and Goldfeld AE. 1998. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter. *Tissue Antigens* 52:359-367.
270. Ulich TR, Del Csatillo J, and Keys M. 1987. Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha-induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes. *J. Immunol.* 139:3406-15.
271. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, and Furth EE. 1995. 92-Kd Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am. J. Pathol.* 146:148-56.
272. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwatuw K, and Strauss JF. 1996. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174:1371-6.
273. Van der Poll T, Buller HR, and ten Cate HT. 1990. Activation of coagulation after administration of TNF to normal subjects. *N. Engl. J. Med.* 322:1622-27.

274. Van der Poll T, Jansen J, van Leeden D, von der Möhlen M, Levi M, ten Cate H, Gallati H, ten Cate JW, and van Deventer SJ. 1993. Release of soluble receptors for tumor necrosis factor in clinical sepsis and experimental endotoxemia. *J. Infect. Dis.* 168:955-960.
275. Van Hattum J, Schreuder GM, and Schalm SW. 1987. HLA antigens in patients with various courses after hepatitis B virus infection. *Hepatology* 7:11-14.
276. Van Ostade X, Vandenamee P, Everaerd B, Loetscher H, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W, Tavernier J, Brouckaert P, and Fiers W. 1993. Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 361:266.
277. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, and Lowry SF. 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor  $\alpha$  in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4845-4849.
278. Vandenamee P, Declercq W, Beyaert R, and Fiers W. 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell. Biol.* 5:392.
279. Varner MW. 1991. Autoimmune disorders and pregnancy. *Semin. Perinatol.* 15:238-250.
280. Vermeulen G, and Bruinse H. 1999. Prophylactic administration of clindamycin 2% vaginal cream to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women with an increased recurrence risk: a randomised placebo-controlled double-blind trial. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 106:652-7.
281. Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, Sargent I, and Redman C. 1992. Location of tumour necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 88:174-180.
282. Vincenz C and Dixit VM. 1997. Fas-associated death domain protein interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J. Biol. Chem.* 272:6578-6583.
283. Waage A, Halstensen A, and Espevik T. 1987. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1:355-59.
284. Wang X, Zuckerman B, Coffman GA, and Corwin MJ. 1995. Familial aggregation of low birth weight among whites and blacks in the United States. *N. Engl. J. Med.* 333:1744-49.
285. Watkinson M and Rushton DI. 1983. Plasmodial pigmentation of placenta and outcome of pregnancy in West African mothers. *Br. Med. J. (Clin Res Ed)* 287:251-254.
286. Weatherstone K, and Rich E. 1989. Tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 secretion by cord blood monocytes from premature and term neonates. *Pediatr. Res.* 25:342-346.
287. Webb GC, and Chaplin DD. 1990. Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J. Immunol.* 15:145.
288. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, and Hooper DC. 1984. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 63:133-154.
289. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, and Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today* 14:353-356.
290. Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourteele S, Müller G, Cheurich P, and Wajant H. 1997. Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80. *J. Immunol.* 158:2398.
291. Weiss T, Grell M, Siemienski K, Mühlenbeck F, Dürkop H, Pfizenmaier K, Scheurich P, and Wajant H. 1998. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J. Immunol.* 161: 3136-3142.

292. Wenstrom KD, Andrews W, Bowles NE, Towbin JA, Hauth J, and Goldenberg RL. 1988. Intrauterine viral infection at the time of second trimester genetic amniocentesis. *Obstet. Gynecol.* 92:420-4.
293. Wheeler AP, Jesmok G, and Brigham KL. 1990. Tumour necrosis factor's effect on lung mechanics, gas exchange and airway reactivity in sheep. *J. Appl. Phys.* 68:2542-2549.
294. Wideman GL, Baird GH, and Bolding OT. 1964. Ascorbic acid deficiency and premature rupture of fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 88:592-5.
295. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, and Duff GW. 1992. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) gene detectable by *NcoI* restriction of PCR product. *Hum. Mol. Genet.* 1:353.
296. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LBA, and Duff GW. 1993. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J. Exp. Med.* 177:557-60.
297. Wilson AG, Clay FE, Crane AM, Cork MJ, and Duff GW. 1995. Comparative genetic association of human leukocyte antigen class II and tumor necrosis factor- $\alpha$  with dermatitis herpetiformis. *J. Invest. Dermatol.* 104:856-58.
298. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, and Duff GW. 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3195-9.
299. Winzen R, Kafert S, Preis B, Mylius-Spencker HA, Resch K, and Holtmann H. 1996. Interaction between the mRNA of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor and cellular proteins. *J. Biol. Chem.* 271:13461-13467.
300. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, and Mak TW. 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12:806-819.
301. Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, and Gillis S. 1993. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type-II collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 151:6602.
302. Wu WS, and McClain KL. 1997. DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J. Interferon Cytokine Res.* 17:631-635.
303. Yates SNR. 1995. Human genetic diversity and selection by malaria in Africa. D. Phil. thesis. Univ. Oxford. 271pp.
304. Yuan J. 1997. Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:247-251.
305. Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, and Kyriakis JM. 1998. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and p38. *J. Biol. Chem.* 273:22681-22692.
306. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG and Guilbert L. 1994. Functional, long-term cultures of human term trophoblast purified by column-elimination of CD9 expressing cells. *Placenta* 15: 819-827.
307. Zavaglia C, Bortolon C, Ferrioli G, Rho A, Mondazzi L, Bottelli R, Ghessi A, Gelosa F, Iamoni G, and Ideo G. 1996. HLA typing in chronic type B, D and C hepatitis. *J. Hepatol.* 24:658-65.
308. Zheng LX, Fisher G, Miller RE, Perschon J, Lynch DH, and Lenardo MJ. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348.
309. Zola H, Fusco M, Macardle PJ, Flego L, and Robertson D. 1995. Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: Comparison with adult blood lymphocytes. *Pediatr. Res.* 38:397-403.

310. Zumbansen M and Stoffel W. 1997. Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B in acid sphingomyelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272:10904-9.