

197  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PRODUCCION Y LIBERACION DE INTERLEU-  
QUINA-1 ALFA POR MACROFAGOS DE  
CALOSTRO HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ADELAIDA SARUKHAN CASAMITJANA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

JULIO 1990



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# CONTENIDO

I. RESUMEN	P. 1
II. INTRODUCCION	2
A. LINFOCINAS	2
1. DESCUBRIMIENTO DE LAS LINFOCINAS	
2. NOMENCLATURA Y CLASIFICACION	
3. ESTRUCTURA GENERAL DE LAS LINFOCINAS Y SUS RECEPTORES	
a. PURIFICACION	
b. ESTRUCTURA GENICA	
c. ESTRUCTURA PROTEINICA	
d. RECEPTORES	
4. BIOLOGIA DE LAS LINFOCINAS	
B. INTERLEUQUINA I	11
1. DESCUBRIMIENTO	
2. ESTRUCTURA GENICA	
3. ESTRUCTURA PROTEINICA	
4. PRODUCCION Y LIBERACION DE IL-1	
5. EFECTOS BIOLOGICOS DE LA IL-1	
C. SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO	20
1. ORIGEN	
2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS	
3. PRODUCTOS DE SECRECION	
4. FUNCION DE LOS MONOCITOS/MACROFAGOS	
D. IMPORTANCIA DEL CALOSTRO	31
1. COMPONENTES INMUNOLOGICOS DEL CALOSTRO	
III. MATERIALES Y METODOS	37
1. POBLACION ESTUDIADA	
2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	
3. ENSAYO DE IL-1 <sub>a</sub>	
4. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS	
IV. RESULTADOS	42
1. OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES Y MACROFAGOS	
2. PRODUCCION DE IL-1 <sub>a</sub>	
3. REGRESIONES SIMPLES	
V. DISCUSION	51
VI. CONCLUSION	61
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63

## I. RESUMEN

Debido a la importancia del calostro en la transmisión pasiva de inmunidad al neonato, en este estudio se quiso determinar el posible papel de los macrófagos del calostro humano en el aporte de IL-1 para la activación del sistema inmune del neonato. Para esto, se midió la IL-1 $\alpha$  intracelular y la liberada por macrófagos del calostro en respuesta a lipopolisacárido (LPS) y sílice en catorce mujeres puérperas, y se comparó con la de los monocitos de sangre periférica de los mismos sujetos. La IL-1 $\alpha$  liberada, la intracelular y la total (intracelular más liberada) fue mayor para los monocitos de sangre que para los macrófagos de calostro, en cualquiera de las tres condiciones (basal, LPS o sílice). Los monocitos de sangre sí responden ante los estímulos de LPS o sílice, aumentando notablemente la IL-1 $\alpha$  intracelular en el primer caso y la IL-1 $\alpha$  liberada en el segundo caso. En cambio, los macrófagos del calostro no presentan aumento en la IL-1 $\alpha$  liberada o intracelular en respuesta al LPS, e incluso la disminuyen ligeramente en respuesta al sílice.

Esta notable inhibición en la producción de IL-1 $\alpha$  por parte de los macrófagos del calostro puede reflejar una importante función protectora de los mismos al evitar producir en el neonato efectos como fiebre e inflamación que serían ocasionados por altas descargas de IL-1. Es posible que las bajas cantidades de IL-1 $\alpha$  producidas por los macrófagos sean suficientes para intervenir en la activación del sistema inmune inmaduro del neonato; o bien, es posible que el neonato no requiera de la transmisión pasiva de IL-1 mediante el calostro y que el papel de los macrófagos del calostro en el intestino del neonato consista en realizar otras funciones como la de presentación de antígeno, fagocitosis, etc.

## II. INTRODUCCION

## A. LINFOCINAS

### I. DESCUBRIMIENTO DE LAS LINFOCINAS

Durante la década de los sesentas, se llevó a cabo una intensa investigación sobre los orígenes y regulación de las respuestas inmunes celulares. Se observó que algunos factores solubles generados *in vitro* sobrenadantes de cultivos de linfocitos incubados con un antígeno específico i) producían lesiones cutáneas similares a las de hipersensibilidad de tipo tardía, ii) eran mitogénicos para linfocitos y iii) podían causar inhibición de la migración de macrófagos. Esto sugería la existencia de mediadores moleculares que intervienen en las respuestas inmunes celulares.

El término linfocina se introdujo en 1969 para describir "factores solubles generados por la interacción de linfocitos sensibilizados con antígeno específico, y expresados sin referencia a la especificidad inmunológica" (1). El término se escogió para enfatizar su origen (linfocitos) y su papel en mantener la fisiología del sistema inmune (cinesis). Los sobrenadantes crudos de cultivos pueden influir, *in vitro*, sobre el comportamiento de un gran número de células blanco de distintas maneras, lo cual indica que muchas interacciones inmunes celulares son reguladas por factores solubles (2).

Para 1970, el término linfocina empezó a usarse de manera más general, para describir todas las actividades biológicas adjudicadas a factores bioquímicos en sobrenadantes de linfocitos T activados ya sea con antígenos o mitógenos (por ejemplo fitohemaglutinina y concavalina A), así como de células no linfoides. Además, se describieron actividades biológicas similares en líquidos corporales como suero y orina.

Durante este periodo, hubo un escepticismo considerable con respecto a la función e incluso a la existencia de las linfocinas. Para muchos investigadores, el gran número de actividades (más de 100 fueron citadas en

una lista publicada en 1979 (2)), sus fuentes tan diferentes y la falta de caracterización bioquímica, eran suficientes para sugerir que todo el concepto estaba basado en un artificio.

Sin embargo, para fines de los setentas, una serie de avances técnicos condujeron a la purificación de algunas de las linfoquinas. Este progreso ha continuado con la introducción de técnicas de biología molecular, y ha resultado en un mejor entendimiento de la estructura de estos mediadores y su función. Ahora está claro que las células del sistema inmune secretan y responden a factores solubles que tienen una amplia variedad de efectos. Mientras que las células T y los macrófagos son la principal fuente de dichos factores, otras células también pueden producirlos. Estos factores no sólo son importantes en la regulación y diferenciación de las células que responden al antígeno, sino también en las interacciones inflamatorias y fisiológicas entre células inmunes y no inmunes.

## 2. NOMENCLATURA Y CLASIFICACION

Al principio, las linfoquinas se nombraron con base en la actividad que producían *in vivo* o, más frecuentemente, *in vitro*, y los nombres se abreviaron en acrónimos. Por ejemplo, el factor de inhibición de la migración, o MIF (migration inhibition factor) se generaba en cultivos de linfocitos activados con antígeno y, cuando se añadía a macrófagos peritoneales no inmunizados, inhibía la migración de éstos a tubos capilares (3).

Posteriormente, se introdujeron otros términos para intentar ordenar el gran número de acrónimos y títulos dados a los factores clasificados bajo el nombre general de linfoquinas. Así pues, los términos monocina y citocina se usaron para mediadores biológicos producidos por monocitos y células no linfoides respectivamente, para así poder diferenciarlas de las linfoquinas producidas por los linfocitos (4).

El término interleuquina (entre leucocitos) apareció por primera vez en 1979, para tratar de solucionar los problemas generados por una nomenclatura asociada a los resultados de bioensayos aislados (5). Las limitantes de una nomenclatura basada en los resultados de un solo bioensayo se hicieron aparentes cuando se comprobó que una misma sustancia podía tener una gran variedad de efectos biológicos. Por ejemplo, el factor derivado de monocitos que causa activación de linfocitos, llamado originalmente factor activador de linfocitos (LAF), resultó ser el mismo que el factor originalmente conocido como proteína mitogénica (MP), factor III de sustitución de células T (TRF-III), factor activador de células B (BAF) y un factor de diferenciación de células B (BDF). El factor se rebautizó con el nombre de interleuquina 1 (IL-1). Así mismo, resultó que el factor de crecimiento de células T (TCGF) era el mismo que el factor mitogénico de tímocitos (TMF) y el factor de ayuda a células citotóxicas (KHF), y fue rebautizado con el nombre de interleuquina 2 (IL-2) (6).

El poder atribuir una gran variedad de efectos biológicos a una misma sustancia, como ocurrió con la IL-1 y la IL-2, fue posible gracias al desarrollo de mejores técnicas bioquímicas para el análisis de los sobrenadantes celulares y la purificación de los factores, así como la producción de grandes cantidades de los mismos por medio de la ingeniería genética.

Actualmente, los términos interleuquina, monocina y citocina son utilizados ampliamente, aunque el término linfocina sigue usándose para describir cualquier proteína soluble que influya sobre células del sistema inmune, independientemente de su origen.

Hasta la fecha, existen 8 interleuquinas clonadas, así como una serie de linfocinas que conservan su nomenclatura basada en el efecto de las mismas. El número real de linfocinas todavía no se conoce, e indudablemente hay otras linfocinas importantes aún no clonadas o parcialmente descritas.



### 3. ESTRUCTURA GENERAL DE LAS LINFOCINAS Y DE SUS RECEPTORES

#### a. PURIFICACION

Desde los primeros estudios, se demostró que las linfocinas son proteínas o glucoproteínas diferentes a las inmunoglobulinas. A pesar de numerosos intentos, por muchos años fue difícil un análisis bioquímico más profundo de las mismas. Esto se debió a las pequeñas cantidades producidas por los cultivos celulares, y por la frecuente pérdida de actividad de las interleuquinas tras la purificación de las mismas. La poca información que lograba obtenerse era, con frecuencia, contradictoria, sobretodo con respecto al tamaño molecular de las proteínas.

Una serie de avances hicieron posible un mejor estudio de la estructura bioquímica de las linfocinas: se lograron crear líneas celulares e hibridomas en grandes volúmenes de medio de cultivo del cual era posible purificar la linfocina, y las células podían ser estimuladas con una mezcla de agentes superinductores de la producción. A medida que los métodos de separación bioquímica y detección para proteínas fueron haciéndose más sensibles, fue posible purificar las linfocinas a partir de fuentes naturales. Con los avances en la clonación de genes, se logró producir grandes cantidades de estas proteínas en procariontes o eucariontes. La disponibilidad de grandes cantidades de las linfocinas puras ha permitido un mejor análisis de la actividad biológica de las mismas *in vivo* e *in vitro*, así como el contar con agentes potencialmente terapéuticos.

#### b. ESTRUCTURA GENICA

Las linfocinas están codificadas por genes para los cuales hay una sola copia por célula haploide. Como la mayoría de los genes de los eucariontes, los

genes de las linfocinas están segmentados, compuestos por exones (presentes en ARNm maduro) que están separados por intrones (ausentes en el ARNm maduro). La mayoría de los genes de las linfocinas tienen de 3 a 4 intrones y de 4 a 5 exones, y están localizados en diferentes cromosomas. En humano, los genes de la mayoría de las linfocinas están localizadas en el cromosoma 5, mientras que los genes para el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta están en el cromosoma 6, en medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La localización de los genes de linfocinas en el mismo cromosoma sugiere la posibilidad de que estén ligados y bajo la influencia de los mismos elementos reguladores (6).

Las linfocinas son generalmente producidas por células en respuesta a las señales de inducción generadas en la superficie celular. Muchas linfocinas como por ejemplo IL-2, IL-3 e interferón gamma (IFN-g) comparten secuencias nucleotídicas en el extremo 5' de sus genes, que pueden tener algún papel en la iniciación de la transcripción y en la expresión coordinada de los genes que se expresan durante la estimulación celular (6). La producción de linfocinas parece estar controlada especialmente a nivel de transcripción. El estudio detallado de la estructura de los genes de las linfocinas y las secuencias que los bordean dará información sobre el control de su regulación a nivel de ADN.

La homología génica entre linfocinas humanas y murinas van del 29% (para la IL-3) hasta el 70% (para la IL-5) (7).

### c. ESTRUCTURA PROTEINICA

Las sondas de ADNc para las linfocinas corresponden a proteínas de 100 a 200 residuos de aminoácidos. La mayoría tienen una secuencia "señal" hidrofóbica de unos 20 aminoácidos, la cual es cortada para generar la proteína madura. En los factores derivados de macrófagos (TNF alfa, IL-1 alfa e IL-1 beta), una pre-secuencia considerablemente larga, de 70 o más residuos de

aminoácidos, es cortada de la proteína madura. Debido a que dichas secuencias señal están asociadas con el transporte de la proteína hacia el exterior de la célula, esta diferencia en el tamaño de las mismas pueden reflejar variantes importantes entre los mecanismos secretores de macrófagos y de los linfocitos (7). El análisis de la secuencia de aminoácidos de las linfoquinas muestra que la mayoría de éstas posee residuos de cisteína que pueden ser importantes en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares.

Las determinaciones del peso molecular de las linfoquinas purificadas de fuentes naturales sugieren que éstas no son homogéneas, y que tienen pesos mayores a aquellos predichos con base en los genes clonados. Estas discrepancias se deben a modificaciones post-transcripcionales, en especial la glucosilación. La mayoría de las linfoquinas están N-glucosiladas, y las proteínas glucosiladas pueden formar oligómeros. El papel de la glucosilación aún no está claro, pues las linfoquinas recombinantes producidas en *Escherichia coli*, la cual no puede glucosilar proteínas, tienen la misma actividad biológica y la misma vida media in vivo que sus equivalentes glucosilados (6).

#### **d. RECEPTORES**

El receptor actualmente más estudiado es el de la IL-2, del cual se han clonado ambas cadenas. Al igual que las linfoquinas, la expresión de los receptores puede ser inducida por estimulación celular, de manera que los receptores normalmente ausentes o en cantidades muy bajas en la célula, incrementan durante la activación celular para posteriormente regresar a su nivel basal. Como todo receptor, poseen dominios extracelulares que reconocen al ligando, una región hidrofóbica transmembrana y un dominio intracelular. Los acontecimientos que ocurren después de la unión del ligando a su receptor se han descrito en otros sistemas, e incluyen la síntesis de nucleótidos cíclicos e hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5- bifosfato, así como la activación de la proteína-quinasa C y la elevación de calcio intracitoplásmico. Otra característica general de

la interacción ligando-receptor es la internalización de dicho complejo por endocitosis mediada por receptores (8). Muchos estudios sugieren que las linfocinas entran a la célula de esta manera, aunque se desconocen la consecuencia final y el destino de los dos componentes.

#### 4. BIOLOGIA DE LAS LINFOCINAS

La mayoría de la información sobre los efectos biológicos de las linfocinas viene de estudios *in vitro*. Se sabe poco sobre el efecto de inyección de linfocinas en animales, aunque el uso clínico reciente de dichos factores clonados está aportando mayor información. Se sabe aún menos sobre la generación de linfocinas y la distribución de sus receptores *in vivo*.

La detección de linfocinas se hace generalmente por medio de bioensayos *in vitro*, aunque los ensayos basados en la antigenicidad de las moléculas como por ejemplo radioinmunoanálisis (RIA) o ensayos de inmunoabsorbencia asociada a enzimas (ELISA), son cada vez más usados.

Existe gran dificultad al interpretar los resultados de los bioensayos si se tiene una mezcla de linfocinas como sucede en cultivos de linfocitos activados, o si las células blanco no están puras. Esto sucede porque varias linfocinas pueden producir efectos biológicos similares. Por ejemplo, la IL-4 produce estimulación de timocitos y de células T, usadas en bioensayos para IL-1 e IL-2 respectivamente (9). Además, una linfocina puede inducir la producción de otras que a la vez influyan sobre diferentes células en una población heterogénea de células blanco, o que puedan interferir positiva o negativamente en ensayos con células homogéneas.

A pesar de las limitantes anteriores, los bioensayos han permitido establecer lo siguiente: las linfocinas son producidas por diferentes células, generalmente en respuesta a su activación; algunas, como la IL-2, parecen ser producidas por un solo tipo celular (células T), mientras que otras como la IL-1 pueden ser producidas por células muy diferentes entre sí; finalmente, las

células blanco de las linfocinas también pueden ser restringidas o diversas (Tabla I).

Un aspecto importante de la actividad de las linfocinas es que frecuentemente actúan juntas para producir efectos. Por ejemplo, la IL-2 y la IL-4 actúan sinérgicamente y causan proliferación de células T (9).

A las linfocinas con frecuencia se les ha llamado hormonas (10) debido a que pueden ser producidas por una célula y pueden actuar sobre un sitio distante, influyendo sobre la fisiología normal. Las linfocinas también pueden actuar como mediadores autócrinos, pues tienen efectos sobre la misma célula que los produce (como por ejemplo la IL-1 y la IL-2).

TABLA 1. FUENTE Y BLANCO CELULARES DE LAS LINFOCINAS  
(Adaptada de Hamblin, 1988)

LINFOCINA	FUENTE CELULAR	BLANCO CELULAR
IL-1a y b	macrófagos, endoteliales, leucocitos granulocitos, B, fibroblastos, epiteliales, astrocitos, queratinocitos, osteoblastos	timocitos, neutrófilos, hepatocitos, condrocitos, musculo, endoteliales epidermis, osteocitos, macrófagos, T, B fibroblastos
IL-2	T	T, B, macrófagos
IL-3	T	multipotenciales, mastocitos
IL-4	T	T, B, macrófagos, mastocitos, progenitores hematopoiéticos
IL-5	T	eosinófilos, B
IL-6	T, fibroblastos	B, timocitos
IL-7	T	timocitos, hematopoiéticas, neutrófilos, T
IL-8	T	T, neutrófilos
TNFA	macrófagos, T timocitos, B, NK	tumorales, líneas celulares transformadas, fibroblastos, macrófagos, osteoclastos, neutrófilos adipocitos, eosinófilos, endoteliales, condrocitos, hepatocitos
TNFB	T	tumorales, líneas celulares transformadas, neutrófilos, osteoclastos
IFN-g	T, leucocitos granulocitos	muchos tipos celulares
IFN-b	macrófagos, fibroblastos	muchos tipos celulares
IFN-a	macrófagos	muchos tipos celulares
GM-CSF M-CSF G-CSF	T	hematopoiéticas

## B. INTERLEUQUINA 1

### 1. DESCUBRIMIENTO

La interleuquina 1 (IL-1) es un importante miembro de los mediadores polipeptídicos agrupados bajo el nombre de las linfocinas. Se describió por primera vez en los años 40, bajo el nombre de pirógeno endógeno debido a su habilidad para producir fiebre (11). Posteriormente, fue aislada una proteína bajo el nombre de mediador leucocítico endógeno (12), el cual se vio que inducía síntesis de proteínas de fase aguda por parte del hígado, y producía neutrofilia. Por otro lado, se describió un factor activador de linfocitos (LAF) (13), el cual aumentaba la respuesta de los linfocitos T a mitógenos y antígenos. Actualmente, el término IL-1 incluye el pirógeno endógeno originalmente descrito, el mediador leucocítico endógeno, el factor de activación de linfocitos, así como el factor de células mononucleares (14), la catabolina (15), el factor activador de osteoclastos (16) y la hemopoyetina-1 (17).

### 2. ESTRUCTURA GENICA DE LA IL-1

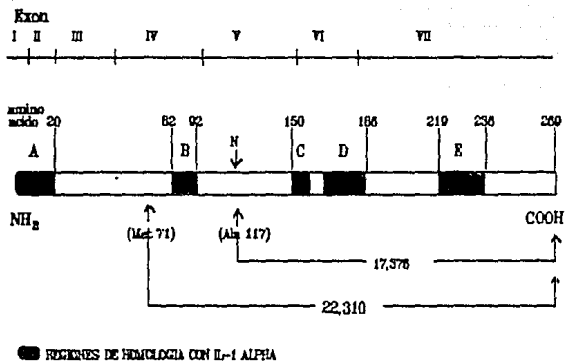
Se han descrito dos moléculas de IL-1, bioquímicamente distintas: IL-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) e IL-1 beta (IL-1 $\beta$ ). Ambas están relacionadas estructuralmente y poseen la misma actividad biológica, o muy parecida. Sin embargo, están codificadas por genes separados, ambos localizados en el cromosoma 2 y con 7 exones cada uno (18,19) (figura 1).

En cuanto a la secuencia de aminoácidos, hay una homología del 61 al 65% entre la IL-1 $\alpha$  humana, de conejo y de ratón; y la IL-1 $\beta$  tiene un 26 a 33% de homología con IL-1 $\alpha$  en las tres especies. Estos resultados sugieren que los genes de IL-1 surgieron por duplicación génica antes de o durante la evolución de los vertebrados, después de lo cual divergieron independientemente (20).

La gran parte de la IL-1 producida por los monocitos estimulados es IL-1 $\beta$ , cuyo ARNm es de 10 a 50 veces más abundante que el de IL-1 $\alpha$  (21).

FIGURA 1

PRECURSOR DE LA IL-1 BETA HUMANA





### 3. ESTRUCTURA PROTEINICA

Los genes de la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  codifican para proteínas precursoras de 271 y 269 residuos de aminoácidos, respectivamente. Los 154 (IL-1 $\alpha$ ) y 153 (IL-1 $\beta$ ) aminoácidos carboxi-terminales, que corresponden al extremo carboxilo de la secuencia de las moléculas precursoras, componen la IL-1 biológicamente activa (6). Por lo tanto, las IL-1 se sintetizan como moléculas precursoras grandes (35 kilodaltons (kd)) que son procesadas a nivel de membrana celular o extracelularmente para dar lugar a proteínas maduras de 15 a 17 kd.

La confusión inicial originada por los resultados contradictorios en diferentes laboratorios en cuanto a las características bioquímicas de la IL-1 se ha aclarado gracias a la clonación de los genes para IL-1. La IL-1 $\beta$  corresponde a la IL-1 descrita con un pI de 6.8, mientras que la IL-1 $\alpha$  corresponde a las especies de IL-1 con pI de 5 y 6.

En humanos, la IL-1 $\beta$  comparte 27% de homología en secuencia de residuos de aminoácidos con la IL-1 $\alpha$  (22). Esta homología es significativa, y se localiza principalmente en el extremo carboxilo: los residuos de aminoácidos 150 a 186, codificados por el sexto exón, y los residuos 219 a 236, codificados por el séptimo exón. Debido a que ambas IL-1 son reconocidas por el mismo receptor (23), y hay reportadas a la fecha muy pocas diferencias entre la actividad biológica de ambas, dichas regiones homólogas posiblemente sean de gran importancia en la unión al receptor y la bioactividad resultante de dicha unión.

Las moléculas de IL-1 no poseen las secuencias señal de corte típicas, y carecen de regiones hidrofóbicas importantes. La ausencia de proteínas de 15 a 17 kd adentro de las células sugiere que las moléculas precursoras son procesadas a nivel de membrana o extracelularmente por la acción de proteasas de serina. El sitio preciso de corte en la proteína precursora aparentemente puede variar. Esto explicaría la heterogeneidad reportada en el tamaño de las

moléculas biológicamente activas.

En cuanto a la estructura terciaria de las IL-1, ambas están compuestas de regiones similares de láminas  $\beta$  plegadas y no poseen uniones disulfuro ni sitios potencialmente glucosilables. Los estudios cristalográficos de la IL-1 $\beta$  muestran que los extremos amino y carboxilo quedan hacia el exterior de la proteína, y cercanas entre sí, por lo que ambos extremos pueden participar en el reconocimiento del receptor. Experimentos en los que se eliminan residuos de aminoácidos específicos sugieren que la histidina (posición 147) puede contribuir al reconocimiento del receptor para la IL-1 (24).

#### 4. PRODUCCION Y LIBERACION DE IL-1

##### a. PRODUCCION

Esta molécula, originalmente descrita como un producto de los monocitos/macrófagos activados por estimulación antigénica, puede ser sintetizada por una gran variedad de células: fibroblastos sinoviales, queratinocitos, células de Langerhans de la piel, células mesangiales del riñón, linfocitos B, células citotóxicas naturales (NK), astrocitos, células endoteliales, músculo liso, células epiteliales del timo, y algunos linfocitos T.

La transcripción de la IL-1 puede activarse en monocitos por adherencia de éstos a superficies extrañas, sin que el ARNm sea traducido a proteína. En algunos ratones con defecto génico, hay un alto nivel de transcripción y bajo nivel de traducción de la proteína (25). Al estimular a las células con agentes como endotoxina (lipopolisacárido (LPS)), sílice, latex, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) o por fagocitosis, no sólo aumenta la transcripción sino también la traducción y procesamiento del precursor de la IL-1. En el caso de la IL-1 $\beta$ , el periodo breve de transcripción de la misma puede incrementarse al suprimirse la síntesis de una proteína represora (26).

La traducción de la IL-1 se reduce por aumento de AMPc inducido por prostaglandinas (27), mientras que la transcripción puede bloquearse con

corticoesteroides administrados antes de la activación celular (28). Los ionóforos de calcio y los productos de la lipoxigenasa araquidónica (leucotrienos) sirven de señal positiva, y el IFN- $\gamma$  aumenta la producción de IL-1 en cultivos de monocitos estimulados con LPS (29).

## **b. LIBERACION**

Al carecer de una secuencia típica de corte, una cantidad considerable de IL-1 permanece asociada a la célula, ya sea intracelularmente (30) o como parte de la membrana celular (31). El precursor de IL-1 de 31 kd y una forma de 22 kd se encuentran asociados con la célula, y ésta última posiblemente sea la IL-1 membranal (32). El procesamiento de IL-1 es llevado a cabo por proteasas de serina, particularmente elastasa y plasmina (33,34). La IL-1 membranal, primero descrita por Unanue y cols., es biológicamente activa y funcional y antigénicamente similar a la IL-1 soluble. Sin embargo, se induce de manera más temprana y persiste más tiempo que esta última (35). La IL-1 membranal parece inducirse por la interacción con células T de ayuda (36), y seguramente es la responsable de los efectos inmunoestimulatorios de IL-1 en tejidos locales como nódulos linfoides, articulaciones y la piel. Participa en la presentación antigénica y es activa en células no linfoides como condrocitos y hepatocitos. El concepto de la IL-1 membranal explica la habilidad de la IL-1 de participar en fenómenos autócrinos y parácrinos sin inducir los efectos sistémicos que ocurren cuando la IL-1 es procesada y liberada a la circulación. Existe evidencia fuerte que sugiere que la IL-1 membranal es IL-1 $\alpha$  (37), mientras que la IL-1 $\beta$  se secreta, aunque también hay IL-1 $\beta$  asociada a la célula.

Por lo anterior, no es de extrañarse que la cinética en la producción y liberación de ambas IL-1 sean diferentes e independientes una de otra. La IL-1 $\alpha$ , que corresponde a la IL-1 intracelular descrita por Lepe-Zuñiga (38), alcanza niveles máximos a las 6 horas de estimulación, mientras que la IL-1 $\beta$ , descrita como IL-1 extracelular por Lepe-Zuñiga (38), alcanza niveles máximos entre las

12 y 16 horas de estimulación. Además, el 80% de la IL-1 $\alpha$  permanece asociada a la célula las primeras 24 h., mientras que el 80% de la IL-1 $\beta$  se secreta a partir de la sexta hora de estimulación (39).

## 5. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA IL-1

La IL-1 tiene efectos a nivel de todo el sistema, así como efectos locales e inmunológicos (Tabla II). Es uno de los mediadores clave de la respuesta del organismo a invasión microbiana, inflamación, reacciones inmunológicas, y lesión tisular. Como ya se dijo, no se han reportado diferencias importantes entre la actividad biológica de la IL-1 $\alpha$  y la de IL-1 $\beta$ .

### a. EFECTOS SISTEMICOS:

En cuanto a los efectos a nivel de sistema endócrino, la IL-1 actúa sobre el centro termoregulador del hipotálamo y así induce fiebre. Aparentemente lo hace por medio de la síntesis de prostaglandinas (PG), las cuales elevan la síntesis de cAMP que a la vez puede actuar como neurotransmisor (22). La propiedad de la IL-1 de inducir la síntesis de PG es posiblemente una de sus características biológicas más importantes, responsable de la mayoría de sus efectos locales y generales. La IL-1 también induce la liberación de varios péptidos hipotalámicos y pituitarios, que incluyen endorfinas, ACTH, y somatostatina (40). De manera directa, aumenta la síntesis de esteroides, la excreción de sodio y los niveles de insulina. Sin embargo, la sobreestimulación con IL-1 resulta citotóxica para las células  $\beta$ -productoras de insulina (41).

En cuanto a los efectos metabólicos de la IL-1, ésta aumenta la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, mientras que ocasiona una disminución en la síntesis de albúmina. La IL-1 estimula la síntesis de proteína del complemento C3, alfa-1-antiquimiotripsina, glucoproteína  $\alpha$ -1-acida y del inhibidor inter- $\alpha$ -1-tripsina por parte del hígado. En cambio, inhibe la síntesis de

lipoproteína lipasa, lo cual a la vez disminuye la utilización de grasa para la obtención de energía. Animales sanos a los que se les administra IL-1, desarrollan anorexia mediada por el hígado (42).

## **b. EFECTOS INMUNOLOGICOS:**

i) En cuanto al efecto de la IL-1 sobre otras citocinas, se ha visto que la IL-1 incrementa los efectos catabólicos del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF_{\alpha}$ ), también conocido como caquetina, y también sintetizado por los monocitos/macrófagos. De hecho, la IL-1 y el  $TNF_{\alpha}$  comparten varias características biológicas, y los efectos de ambas combinadas generalmente son mayores que los de cada una por separado. Actúan de manera sinérgica en la producción del choque hemodinámico, citotoxicidad de células beta pancreáticas productoras de insulina, producción de PGE por fibroblastos, e inducción de la reacción local de Schwartzman. A pesar de la actividad sinérgica de la IL-1 y el  $TNF_{\alpha}$ , la primera regula de manera negativa los receptores de  $TNF_{\alpha}$  así como los propios (43).

La IL-1 actúa sobre los mismos monocitos/macrófagos donde aumenta su propia síntesis, y sobre los linfocitos T donde aumenta la de la IL-2, el interferón gamma y beta, la IL-3 y la IL-6. El aumento en la producción de IL-1 inducida por sí misma, de IL-2 y de factores de crecimiento de células B, aumenta la respuesta inmune a los antígenos, mientras que la inducción de producción de  $IFN-\gamma$  resulta en un efecto antiproliferativo y antiinflamatorio.

ii) La IL-1 también tiene efectos sobre las células endoteliales y de músculo liso. Induce la síntesis de PGE<sub>2</sub>, PG<sub>12</sub> y factor activador de plaquetas (44), los cuales son fuertes vasodilatadores. Cuando se administra intravenosamente, la IL-1 provoca una caída reversible en la presión arterial. A nivel local, induce la congestión vascular, formación de coágulos, infiltración celular y derramamiento endotelial. La IL-1 altera los receptores de la superficie endotelial, de manera que se adhieren los leucocitos y migran al tejido

extravascular. Aumenta la producción de procoagulante (45) y actividad inhibitoria del activador de plasminógeno por parte del endotelio. En conjunto, la IL-1 promueve la localización de la infección, e induce mecanismos de reparación y regeneración.

iii) La IL-1 tiene un importante papel como mediador en la inflamación y se encuentra en el líquido sinovial de los individuos con artritis inflamatoria y destructiva. Además de atraer a leucocitos hacia tejidos inflamados, la IL-1 causa degranulación de basófilos y eosinófilos, estimula síntesis de tromboxano por macrófagos y neutrófilos, y aumenta la activación de neutrófilos por péptidos quimiotácticos. Por otra parte, induce la síntesis de colágenos y glucosaminoglucanos y es mitogénica para células mesangiales del riñón, células de la glía en cerebro y queratinocitos. Induce la reabsorción del hueso al activar a los osteoclastos.

iv) En cuanto a los efectos de la IL-1 sobre células inmunocompetentes, participa en la activación directa de los linfocitos T, al inducir la transcripción, síntesis y secreción de IL-2 y su receptor por los mismos. La responsable de dicha activación macrófago-linfocito T parece ser la IL-1 membranal.

En presencia de IL-1 aumentan: la respuesta proliferativa de células T y B a factores de crecimiento, la diferenciación y producción de anticuerpos por células B, y la unión de linfocitos citotóxicos naturales (NK) a sus tumores blanco. La IL-1 también es un quimioatrayente para linfocitos. Se considera a la IL-1 como un adyuvante natural, que de manera no específica, incrementa la respuesta inmune a los antígenos y células malignas.

**TABLA II. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA INTERLEUQUINA-1**  
(Adaptada de Dinarello, 1999)

**Efectos sistémicos de la IL-1**

**Sistema Nervioso Central**

- fiebre
- síntesis de PGE-2 por cerebro
- aumento en ACTH
- aumento en corticosteroides
- aumento en sueño lento
- disminución de apetito

**Vasculares**

- mayor adherencia de leucocitos
- mayor síntesis de PGI<sub>1</sub> y PGE
- aumento en factor activador de plaquetas
- mayor actividad procoagulante
- aumento en activador de plasminógeno
- hipotensión
- aumento en frecuencia cardíaca
- disminución del pH sanguíneo (acidosis láctica)

**Metabólicos**

- hipoferremia, hipozincemia
- disminución de enzima citocromo P450
- aumento de proteínas fase aguda
- disminución de síntesis albúmina
- aumento en eliminación bacteriana
- aumento en insulina (disminución por sobredosis)
- inhibición de lipoprotein-lipasas
- aumento en excreción de sodio

**Hematológicos**

- neutrofilia
- linfopenia
- necrosis tumoral
- liberación de la médula ósea
- inhibidor

**Efectos locales de la IL-1**

- atracción de neutrófilos, linfocitos y monocitos (*in vivo*)
- liberación de histamina por basófilos
- degranulación de eosinófilos
- proliferación de fibroblastos y queratinocitos
- aumento en síntesis de colágena y colagenasa
- liberación proteasa de condrocitos
- producción de PGE2 por fibroblastos dérmicos y sinoviales
- citotóxico para células de melanoma, beta productoras de insulina y tirocitos
- mayor reabsorción ósea
- síntesis de IFN $\beta$  por fibroblastos
- síntesis de IL-8

**Efectos inmunológicos de la IL-1**

- Activación de cels.T
- producción IL-2 y aumento en receptores para IL-2
- Activación de cels. B
- sinergia con IL-4, inducción de IL-6, aumento en síntesis de IgM
- Cels. NK
- sinergia con IL-2 e IFN para lisis tumoral, aumento en unión de NK a tumores, producción de IL-1 y TNF por NK
- Aumento en la producción de linfocinas
- IL-2, IL-3, GM-CSF, IFN $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$
- Citotoxicidad de macrófagos
- aumento en la producción de IL-1 y TNF

## C. EL SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR

### 1. ORIGEN DE LAS CELULAS DEL SISTEMA

La principal fuente de IL-1 son los monocitos y macrófagos, los cuales pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. Dicho sistema puede definirse como una línea celular que se origina en la médula ósea, es transportada por el torrente sanguíneo, y se localiza en los tejidos. Se compone, bajo circunstancias normales, de monoblastos, promonocitos y monocitos en médula ósea, monocitos en sangre periférica, y macrófagos en tejido. Se dice que éstas células forman un sistema por su origen común, su morfología similar y sus funciones en común que incluyen la fagocitosis mediada por receptores para la IgG y el complemento C3 (46). El nombre de sistema fagocítico mononuclear reemplaza al de sistema reticuloendotelial usado originalmente.

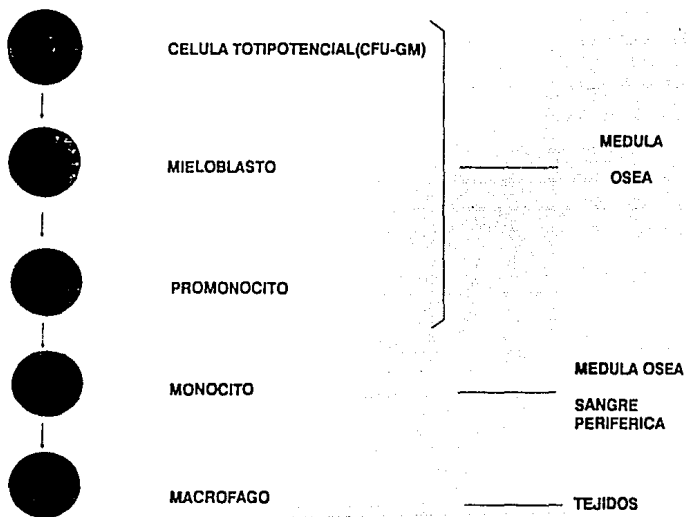
La línea fagocítica mononuclear comparte una célula progenitora común con la serie granulocítica, conocida como unidad formadora de colonia-granulocito/macrófago (CFU-GM). Hay tres o cuatro divisiones celulares entre el monoblasto y el monocito de la sangre periférica (figura 2). Los monocitos recién formados salen de la médula ósea a las 24 horas y permanecen en la sangre periférica por un periodo corto, hasta de 3 días (46). Una vez que los monocitos abandonan la circulación, no regresan a la misma. En los tejidos, los monocitos, sin dividirse, se transforman en macrófagos, con características morfológicas y a veces funcionales específicas según el tejido del que forman parte. Los macrófagos pueden vivir muchos meses. Bajo circunstancias normales, se dividen poco, pero bajo ciertos estímulos pueden proliferar.

El estadio terminal de desarrollo de la línea fagocítica mononuclear es la célula gigante multinucleada, característica de enfermedades inflamatorias granulomatosas como la tuberculosis.



**FIGURA 2**

**COMPONENTES DEL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO**



## 2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS DEL SISTEMA

El monoblasto es prácticamente indistinguible del mieloblasto, y carece de características especiales que permitan distinguirlo. Los promonocitos componen el 3% de la población celular en la médula ósea, miden de 12 a 18  $\mu\text{m}$ , son generalmente esféricos y con un núcleo irregular. El citoplasma contiene filamentos agrupados y dispersos, poco retículo endoplásmico, un aparato de Golgi conspicuo y polisomas abundantes. En promonocitos tempranos, se forma un tipo de gránulo citoplásmico que contiene las enzimas lisosomales fosfatasa ácida, aril-sulfatasa y peroxidasa. Una segunda población de gránulos peroxidasa negativos se forma en los promonocitos maduros y monocitos (47). Los promonocitos son células que se dividen activamente, capaces de endocitar y fagocitar, y que se adhieren a superficies de vidrio. Son anaerobias facultativas. Poseen receptores de superficie para el fragmento Fc de la IgG y el complemento C3 (48).

Los monocitos miden entre 12 y 15  $\mu\text{m}$ , y componen del 3 al 8% de la población de leucocitos de sangre periférica. Los monocitos en circulación son heterogéneos en cuanto a densidad celular, tamaño, morfología y antígenos de superficie, y se han propuesto subtipos de monocitos. En general, el núcleo es arriñonado y el citoplasma es azul-grisáceo con numerosos gránulos azurofilicos. El aparato de Golgi está muy desarrollado, los gránulos lisosomales son numerosos y las mitocondrias están distribuidas uniformemente. Poseen gran cantidad de microtúbulos, microfibrillas alrededor del núcleo y filamentos de actina. Son poco móviles, tienen actividad fagocítica y una fuerte tendencia a adherirse a superficies de vidrio. Contienen esterasas no específicas, peroxidasa, lisosima,  $\beta$ -glucuronidasa, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y otras enzimas hidrolíticas. Tienen receptores para la fracción Fc de la IgG, para el

complemento C3 (48) y para la insulina (49). Los monocitos no se dividen.

Los macrófagos, también llamados fagocitos mononucleares o histiocitos, representan una etapa posterior en la maduración de los monocitos. Miden entre 20 y 80  $\mu\text{m}$ , poseen un núcleo vesicular grande con nucleolos prominentes y el citoplasma contiene mitocondrias grandes, microfilamentos, microtúbulos y filamentos de actina. El aparato de Golgi es grande y bien desarrollado y el retículo endoplásmico rugoso es abundante y con muchos ribosomas. También hay vacuolas digestivas, vesículas cubiertas con clatrina, y muchos lisosomas con gran cantidad de enzimas hidrolíticas. La membrana celular tiene muchas microvellosidades, evidencia de pinocitosis y formación vesicular. No poseen gránulos azurofílicos primarios (47). En la transición de monocito a macrófago, aumentan el número de lisosomas y mitocondrias, la actividad de enzimas mitocondriales y la tasa de respiración celular. A diferencia del monocito, el macrófago maduro prácticamente carece de actividad de peroxidasa (50). Los macrófagos son móviles, con gran capacidad fagocítica. Poseen tres distintos receptores para la porción Fc de IgG: uno para IgG1-G2b, otro para IgG2a y otro para IgG3 (51,52), así como receptores para IgE (53), para insulina (49) y para la proteína C3 del complemento (54).

Algunos monocitos y macrófagos tienen antígenos DR (Ia en el ratón) en la superficie membranar, producto de los genes del sistema principal de histocompatibilidad clase II (HLA-DR). El porcentaje de macrófagos positivos varía desde 15% en macrófagos peritoneales (55) hasta 50% en macrófagos de bazo y timo (56). Sólo los macrófagos positivos pueden interactuar con las células T. El fenotipo positivo de la población se mantiene por proliferación de fagocitos mononucleares menos diferenciados tras estimulación adecuada con mediadores de células T (57).

El paso más importante desde el punto de vista funcional en la maduración del macrófago, es la activación del mismo por medio de linfocinas. Los macrófagos activados sufren una serie de cambios morfológicos,

bioquímicos y funcionales que les permiten tener una respuesta aumentada contra microorganismos, inflamación o neoplasias (Tabla III). Pueden ser activados por mediadores linfocíticos, productos bacterianos, alérgenos, toxinas, partículas fagocitadas, complejos antígeno-anticuerpo, virus, interferón, componentes de complemento, IgE, etc. Aunque aparentemente sólo las linfocinas producidas por las células T (IFN- $\gamma$  y factor estimulador de colonias granulocito-macrófago) son capaces de inducir por sí solas toda la serie de cambios implicados en la activación del macrófago, hay estudios que sugieren que el TNF $\alpha$ , liberado por los mismos macrófagos también puede activarlos (58). Los cambios que ocurren durante la activación incluyen aumento en el tamaño, mayor capacidad de adherencia a superficies, aumento en la formación de pseudópodos y vesículas pinocíticas, etc.

Existen macrófagos en líquido peritoneal, pleural y sinovial, en calostro, en espacios alveolares y en tejidos. Son particularmente abundantes en nódulos linfáticos y espacios sinusoidales. Aunque muy similares entre sí, existen algunas diferencias que dependen de su localización y función.

### 3. PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE LOS MACROFAGOS

Los macrófagos, además de sus propiedades fagocíticas e inmunológicas, poseen una alta capacidad secretora, no sólo de enzimas sino de muchas otras sustancias biológicamente activas además de la IL-1 ya mencionada (Tabla IV).

#### a. Enzimas:

La lisozima o muramidasa es una proteína de bajo peso molecular (14 kd), secretada por monocitos y macrófagos de manera continua, independientemente de la fagocitosis. Tiene una actividad bacteriolítica, incrementa la actividad fagocítica y tiene un efecto antineoplásico.

La proteasa neutra activadora de plasminógeno cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina, lisa fibrina y activa a los componentes C1 y C3 del complemento. Es secretada por macrófagos activados y modulada por actividad fagocítica (59).

Las hidrolasas ácidas, enzimas intracelulares, pueden ser secretadas como resultado de la fagocitosis (60), activación de los receptores para Fc o complemento, o activación por mediadores de células T (61). La liberación de estas enzimas incrementa con la activación del macrófago.

La arginasa cataliza la hidrólisis de arginina a ornitina y urea, y es secretada en altas cantidades por macrófagos activados. Parece ser tóxica para algunas células tumorales, *in vitro* (62).

#### **b. Componentes de complemento:**

Los macrófagos sintetizan y secretan componentes de la vía clásica y alterna del complemento, como son C1q, C2, C3, C4, factor B, factor F, factor D y properidina (63). La proteína C3a puede tener un papel en la mediación de lisis de células tumorales por macrófagos, y la C3b juega un importante papel en la liberación selectiva de hidrolasas ácidas por los mismos (64).

#### **c. Proteínas de unión:**

Los macrófagos liberan transferrina, ferritina, transcobalamina II y fibronectina (58). Esta última es una glucoproteína de alto peso molecular presente en numerosas superficies celulares, tejido conectivo y membranas basales, así como en el plasma. Regula la adhesión célula-célula, la adhesión célula-sustrato, la locomoción celular y la unión de fibrinógeno o colágena a los macrófagos. Juega un papel importante en la eliminación de complejos de fibrina circulantes en la sangre por parte del sistema mononuclear fagocítico.

#### **d. Metabolitos oxigenados:**

Los macrófagos estimulados por fagocitosis o fármacos generan una serie de productos capaces de inhibir o matar agentes infecciosos y células neoplásicas. Estos productos incluyen peróxido de hidrógeno (58), radicales hidroxilo (65) y superóxido (66).

#### **e. Lípidos bioactivos:**

La fagocitosis resulta en un incremento marcado en la síntesis de prostaglandinas, especialmente la E2 (67). Estas tienen un papel clave en mediar reacciones inflamatorias y en la regulación de la función inmune. También hay liberación de leucotrienos, que pueden causar constricción bronquial y que son quimiotácticos para los macrófagos (68) y de factor activador de plaquetas, un fosfolípido mediador de anafilaxis que hace que las plaquetas cambien de forma, se agreguen y liberen su contenido granular.

#### **f. Interferón alfa (IFN $\alpha$ ):**

Es una proteína secretada por monocitos y macrófagos estimulados por virus, toxinas bacterianas y mitógenos, y que protege a las células de infección viral, inhibe la tasa de división celular, aumenta la expresión de antígenos membranales e incrementa la citotoxicidad de células T, NK y macrófagos.

#### **g. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ):**

El TNF $\alpha$ , también conocido como caquectina, es producido por macrófagos después de su estimulación, aunque también puede ser producido por otras células. Algunos de los efectos de TNF $\alpha$  (y TNF $\beta$ , producida por linfocitos T) son: lisis de células tumorales, efectos pirogénicos, anti-tumorales, anti-virales y anti-proliferativos, inducción de expresión de genes MHC clase I, activación de macrófagos, etc. El TNF $\alpha$  y la IL-1 comparten varias propiedades biológicas, y sus efectos combinados son mayores que los de cada una por separado.

**TABLA III. CARACTERÍSTICAS DE LOS MACROFAGOS ACTIVADOS**  
(Tomado de Lasser, 1963)

<b>Morfológicas- aumento en:</b>	
-tamaño	
-adherencia	
-actividad membrana plasmática	
-gránulos citoplásmicos	
<b>Bioquímicas- aumento en:</b>	
-actividad metabólica	-enzimas lisosomales y su liberación
-adenil ciclasa	-dehidrogenasa láctica
-GMP cíclico	-lisozima
-Influjó de Iones de Ca	-colagenasa y elastasa
-oxidación glucosa	-producción de activador de plasminógeno
-interferón	-producción de prostaglandinas
<b>Funcionales- aumento en:</b>	
-pinocitosis	
-fagocitosis	
-actividad microbicida intracelular	
-efectos citotóxicos sobre células tumorales	

**TABLA IV. PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE LOS MACROFAGOS**  
(Tomado de Lasser, 1963)

<b>A. Enzimas</b>		
-lisozima	-arginasa	
-proteasas neutras:	-hidrolasas ácidas:	
activador plasminógeno	proteasas	sulfatasas
colagenasa	esterasas	ribonucleasas
elastasa	lipasas	fosfatasa
proteasa degradadora de	glucosidasas	catelinas
proteoglicanos		
angiotensina convertasa		
<b>B. Componentes del complemento</b>		
-C2, C3, C4	<b>C. Inhibidores de enzimas</b>	
-factor B, F, D	-inhibidor de plasmina	
-properidina	- $\alpha$ -macroglobulina	
<b>D. Proteínas de Unión</b>		
-transferrina	<b>E. Metabolitos de Oxígeno</b>	
-ferritina	-superóxido	
-transcobalamina II	-peróxido de hidrógeno	
-fibronectina	-radical hidroxilo	
<b>F. Lípidos Bioactivos</b>		
-prostaglandinas	<b>G. Linfocinas</b>	
-tromboxano	-interleuquina-1 (IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ )	
-leucotrienos	-interferón (IFNs)	
-factores activadores de plaquetas	-factor necrosis tumoral (TNF $\alpha$ )	

## 4. FUNCIONES DE LOS MONOCITOS/MACROFAGOS

### a. Función fagocítica y microbicida:

Los monocitos y macrófagos juegan un papel clave en la defensa contra una gran variedad de agentes infecciosos. La mayoría de estos microorganismos son fagocitados, inhibidos o destruidos por los macrófagos. Estos también pueden eliminar virus y células infectadas por los mismos (69). Las bacterias y los productos de éstas, así como los factores liberados por linfocitos T activados, son quimiotácticos para los macrófagos, los cuales se acumulan y permanecen en el foco de infección bajo la influencia de un factor inhibitorio de la migración liberado por linfocitos T. La fagocitosis de los microorganismos invasores es un mecanismo complejo que requiere en algunos casos de inmunoglobulinas opsonizantes en la superficie de la célula a fagocitar y en el cual los receptores para la porción Fc de la IgG y para la proteína C3 en la superficie del macrófago son importantes. Si el material fagocitado es un microorganismo, éste debe ser lisado por medio de metabolitos oxidativos como peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilo.

### b. Regulación de la respuesta inmune

Los macrófagos son esenciales en el desarrollo de la inmunidad celular y humoral. Existe una interdependencia cercana entre macrófagos y linfocitos. Para que el linfocito T sea estimulado y funcione como célula de ayuda para el linfocito B, necesita que el macrófago fagocite el antígeno, lo procese y se lo presente en el contexto de las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) clase II (DR). Por otro lado, para que el macrófago funcione a su capacidad óptima contra microorganismos y tumores, necesita ser activado mediante la interacción con linfocinas derivadas de linfocitos T.

Las moléculas DR del macrófago regulan el reconocimiento de antígenos



por los linfocitos T, por lo que sólo los macrófagos que tengan moléculas DR son capaces de presentar antígenos e interactuar con células T. Los macrófagos DR negativos no presentan antígenos pero sí pueden ser activados. Ambos tipos poseen receptores Fc y C3, y fagocitan partículas y bacterias (70).

#### **c. Eliminación de células dañadas o envejecidas**

Una de las principales funciones del sistema mononuclear fagocítico es la eliminación de eritrocitos dañados o envejecidos de la circulación. Los macrófagos reconocen cambios en la superficie membranal del eritrocito, inducidos por recubrimiento con inmunoglobulinas, daño químico, invasión parasítica o senescencia. Los eritrocitos son fagocitados, y la globina es convertida en aminoácidos y bilirubina por la enzima heme oxigenasa del macrófago (71). Los fagocitos mononucleares también eliminan plaquetas, linfocitos y núcleos megacariocíticos senescentes.

La presencia de macrófagos en el desarrollo fetal temprano sugiere que tengan una función importante en la eliminación de desechos al ir siendo sustituido un tejido por otro (46).

#### **d. Control de células tumorales**

Existe evidencia a favor del papel de los macrófagos en el combate de neoplasias: los tumores son comunmente infiltrados por macrófagos, el contenido de éstos en los tumores tiende a relacionarse negativamente con el potencial metastático de éstos últimos y los agentes selectivamente tóxicos para los macrófagos aceleran el desarrollo de tumores. Se puede considerar a los macrófagos como "células primarias de vigilancia antineoplásica". Los macrófagos, capaces de distinguir células tumorales a través de un mecanismo de reconocimiento molecular, pueden destruir a éstas mediante la liberación de productos como enzimas lisosomales, peróxido de hidrógeno, proteinasas citolíticas y factor de necrosis tumoral (72).

#### **e) Hematopoesis**

Los monocitos y macrófagos producen un factor estimulador necesario para la formación y crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF-GM) (73). Así mismo, producen eritropoietina (74), ferritina (75), transferrina y son una fuente de hierro para normoblastos en desarrollo. También producen transcobalamina II, la principal proteína de transporte de la vitamina B12 (76).

#### **f) Otras funciones**

Finalmente, los monocitos/macrófagos también juegan un papel en otros fenómenos como: inducción de actividad procoagulante en células endoteliales, acumulación de lípidos en lesiones arterioescleróticas, liberación de colagenasa e inducción de proliferación de fibroblastos en la cicatrización de heridas, transporte y metabolismo de metales como hierro, zinc y cobre, y regeneración de tejidos.

## **D. IMPORTANCIA DEL CALOSTRO COMO FUENTE DE FACTORES DE**

### **RESISTENCIA A INFECCIONES EN EL NEONATO**

Recientemente, se ha renovado el interés acerca de las propiedades protectoras únicas de la leche materna y de su fase calostrada. Esta última corresponde a la secreción espesa y amarillenta de la glándula mamaria durante las primeras 72 horas. Está bien establecido que la leche materna es el alimento ideal para los requerimientos del neonato, no solo por su valor nutritivo y el contacto con la madre, sino por su capacidad de proteger al neonato de ciertas infecciones, especialmente aquellas que afectan al tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio.

El sistema inmunológico en la leche humana, compuesto de factores solubles y células inmunocompetentes, posee varias características: a) la naturaleza química de los factores de resistencia es muy diversa, puesto que incluye oligosacáridos, polisacáridos con nitrógeno, lípidos, proteínas y glucoproteínas; b) dichos factores también se encuentran en muchas secreciones de mucosas; c) la producción de los factores de resistencia por la glándula mamaria es inversamente proporcional a su producción por el neonato; d) los factores de defensa son capaces de resistir la digestión en el tracto digestivo; e) dichos factores actúan sinérgicamente entre sí y con otros factores producidos por el neonato para eliminar o inhibir el crecimiento de patógenos y f) los agentes inmunológicos de la leche humana protegen al neonato sin generar un efecto inflamatorio en el mismo (77).

## 1. COMPONENTES INMUNOLOGICOS DEL CALOSTRO

Los principales componentes inmunológicos de la leche humana y de la fase calostrada de la misma son:

-Factor de crecimiento de *Lactobacillus*, la principal bacteria encontrada en el colon de los neonatos alimentados con leche materna. Dicha bacteria produce ácido acético el cual inhibe el crecimiento de bacterias y hongos patógenos. Su factor de crecimiento es un polisacárido que contiene nitrógeno, encontrado en leche de humano pero no en leche de vaca (78).

-Oligosacáridos y glucoconjugados, que compiten con receptores de células epiteliales para la unión con ciertos patógenos bacterianos o sus toxinas; por ejemplo, los oligosacáridos con fucosa en leche humana inhiben la adherencia de *Vibrio cholerae* a células epiteliales (79).

-Lípidos, derivados de la hidrólisis de triglicéridos de la leche, son capaces de lisar virus encapsulados, como por ejemplo coronavirus, y parásitos unicelulares como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (80).

-Lisozima, producida por células epiteliales, neutrófilos y macrófagos, lisa bacterias al hidrolizar mucopolisacáridos o mucopéptidos de su pared celular. Esta enzima es muy abundante en el calostro.

-Lactoferrina, también producida por células epiteliales, neutrófilos y macrófagos, priva a las bacterias de hierro e inhibe su crecimiento. La concentración más alta de lactoferrina ocurre en la fase de calostro (81) (Tabla V).

-Inmunoglobulinas: de las 4 inmunoglobulinas presentes en la leche humana (IgG, IgA, IgM e IgD), la IgA representa el 90%, en forma de IgA secretora (sIgA). Es producida por células plasmáticas en la lámina propia de la glándula mamaria, las cuales provienen de las placas de Peyer del intestino y del árbol traqueobronquial. La concentración de sIgA es mayor los primeros días de lactancia (Tabla V).

TABLA V. CONCENTRACION (mg/ml; media  $\pm$  desv. standard) DE FACTORES INMUNOLOGICOS EN LA LECHE HUMANA A LO LARGO DE LA LACTANCIA

Factor	2-3 días	1 mes	6 meses	1 año	2 años
Lactoferrina	5.3 $\pm$ 12.9	1.9 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1
sIgA	2.0 $\pm$ 2.5	1.0 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2
Lisozima	0.06 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.12	0.2 $\pm$ 0.1	0.19 $\pm$ 0.03

-Leucocitos: éstos están presentes los primeros 3 a 4 meses de lactancia, pero la concentración más alta de leucocitos ocurre en el calostro (82). El número promedio de células mononucleares en los primeros días post-parto es de 4 millones de célula por mililitro, cantidad comparable a la concentración de éstas en sangre (83). La mayoría de las células que se encuentran tanto en el calostro como en la leche son macrófagos y linfocitos B y T, aunque también se han encontrado de manera ocasional neutrófilos y células epiteliales (84).

En cuanto a los linfocitos T de la leche, éstos van disminuyendo su concentración al progresar la lactancia (85) y su función en la transmisión pasiva de inmunidad al neonato aún no está clara. La respuesta de dichos linfocitos ante algunos estímulos mitogénicos y antigénicos es distinta a la de linfocitos T de sangre periférica. Esto sugiere que los linfocitos T de la leche materna representan una subpoblación única de células T que llenan las necesidades de un sistema inmune local, diferentes a las del sistema inmune sistémico (84).

Los linfocitos B de la leche, a diferencia de los de la sangre periférica, responden poco a estimulación mitogénica, e, *in vitro*, sintetizan únicamente IgA. Sin embargo, se han detectado las 4 clases de inmunoglobulinas arriba

mencionadas en la leche materna. El calostro tiene concentraciones más altas de inmunoglobulinas que la leche (86). La Ig más abundante en el calostro y la leche es la IgA secretora (sIgA), dirigida principalmente contra antígenos enterobacterianos. También se han encontrado anticuerpos sIgA contra microorganismos como polio, ecovirus, virus de la influenza (86), y contra antígenos bacterianos como antígeno O de *E coli* y enterotoxinas liberadas por *E coli* y *Vibrio cholerae* (87).

La función de los neutrófilos aún no está bien definida, y la presencia de dichas células puede estar relacionada con el aumento en el tamaño de los senos durante los primeros días de lactancia. Tienen poca movilidad y no responden a quimioatrayentes.

Entre el 80 y el 100% de las células mononucleares en el calostro son macrófagos (83) y su concentración en la leche humana es 300 veces mayor a la observada en leche de vaca. Dicha célula es estable en un ambiente ácido comparable al gástrico (88). El macrófago de calostro es una célula fagocítica activa, más móvil que los monocitos de sangre y que muy posiblemente tenga un papel importante en el combate de infecciones tanto en la madre como en el tubo digestivo del neonato. Aproximadamente el 23% de los macrófagos de leche son DR positivos, lo que sugiere que también funcionan como células presentadoras de antígeno (89).

Además de ser una célula fagocítica, el macrófago de calostro y leche también es responsable de la síntesis de varios factores que confieren resistencia al neonato, como son lisozima, componentes C3 y C4 del complemento (90) y lactoferrina (86). La lisozima es capaz de lisar la pared celular de la mayoría de las bacterias. El beneficio de la presencia de los factores C3 y C4 en la leche es más dudoso, puesto que no se han detectado los otros factores de la vía clásica del complemento, y, si los hubiera, prácticamente no hay IgG o IgM para iniciar la cascada del proceso. Sin embargo, el sistema de complemento puede ser activado por una vía alterna (vía

proactivador C3), la cual puede ser iniciada por IgA, la principal inmunoglobulina en la leche. El C3 activado tiene propiedades opsonizantes. La lactoferrina es una proteína que se une a hierro y que se encuentra a una concentración muy alta en la leche (1mg/ml) (91). Tiene mayor afinidad por el hierro que la transferrina de la sangre. Su efecto microbicida parece deberse a su capacidad de privar de hierro a ciertas bacterias como estafilococos y *E coli*. Finalmente, se ha encontrado que el macrófago de calostro posee IgA intracelular y asociada a su membrana. El hecho de que, in vitro, esta inmunoglobulina sea liberada poco a poco, sugiere que el macrófago es un vehículo potencial para el transporte de dicha inmunoglobulina (92).

Debido a que la IL-1 es producida por toda la línea celular monocito-macrófago, resulta de interés saber si estos macrófagos del calostro, además de las funciones de fagocitosis, presentación de antígeno y secreción de factores de resistencia, pudieran tener un papel importante en el aporte de IL-1 para la activación del sistema inmune del neonato. Existe sólo un trabajo al respecto, hecho por Subiza y cols. (93), en que demuestran que la producción de IL-1 por los macrófagos del calostro es 4 a 5 veces menor que la de los monocitos de sangre periférica, y que los primeros son incapaces de liberar la IL-1. Sin embargo, en dicho trabajo no se tomó en cuenta el mecanismo de liberación de IL-1 por daño celular (silíce), y para medir la IL-1 se utilizó un bioensayo basado en proliferación de timocitos de ratón, el cual, como ya se mencionó, no es muy específico. Además, ya está comprobado que la cinética en producción y liberación de ambas IL-1 es muy distinta, por lo que resulta más preciso utilizar un ensayo que distinga entre ambas. Por lo anterior, consideramos necesario retomar el estudio de Subiza y cols. y medir la producción y liberación de IL-1 específicamente, al estimular a los monocitos de sangre y a los macrófagos de calostro con LPS y silíce. Se eligió IL-1.

puesto que, como ya se mencionó, parece ser la más importante en la interacción con y activación de las células T. La IL-1 $\alpha$  se midió mediante un ensayo de ELISA, el cual es mucho más específico y sensible.

### **Objetivos**

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar la producción y liberación de IL-1 $\alpha$  por los macrófagos del calostro.
- Comparar ésta con la producción y liberación de IL-1 $\alpha$  por monocitos de sangre periférica de las mismas mujeres púerperas.



### **III. MATERIALES Y METODOS**

## 1. POBLACION ESTUDIADA

Se analizaron calostro y sangre periférica de catorce mujeres púerperas, que estuvieran entre los 15 y 35 años de edad, con embarazo de término sin complicaciones, sin inflamación mamaria, y con puerperio entre las 0 y 72 horas. El calostro (de 10 a 15 ml) se recolectó, previa limpieza del pezón con jabón y agua, bajo condiciones estériles mediante un tiraleche electrónico. La sangre periférica (20 ml) se extrajo mediante una jeringa heparinizada y estéril.

## 2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La sangre se diluyó en un volumen igual de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) y las células mononucleares se separaron por medio de un gradiente de Ficoll/Hypaque. Estas se lavaron tres veces en PBS, y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI (Sigma) con 10% suero bovino fetal, 1% antibiótico, 1% glutamina, 1% HEPES, y se ajustaron a una concentración de 5 millones de células/ml. Se colocaron 2 ml. de medio (10 millones de células) por pozo en una placa de 24 pozos (Falcon), y las células se dejaron adherir durante dos horas. Al cabo de este tiempo, se lavaron los pozos tres veces con RPMI y de esta manera se desecharon las células no adherentes. Las adherentes, aproximadamente 1 millón de monocitos por pozo, se resuspendieron en RPMI (1 ml de medio por pozo) y se sometieron a 3 condiciones distintas: basal, LPS (cortesía de G.Moller, Universidad de

Estocolmo) a 20 µg/ml. y sílice (Sigma) a 50 µg/ml. Las células se incubaron 20 h, a 37°C, después de lo cual se centrifugaron los sobrenadantes para desechar cualquier resto celular y se congelaron a -70°C

El calostro se diluyó en PBS, se centrifugó, y el botón celular se centrifugó sobre un gradiente de Ficoll/Hypaque para separar las células mononucleares. Estas se ajustaron en medio (RPMI) a 1 millón/ml. No se pusieron a adherir puesto que, por medio de un ensayo con anticuerpo monoclonal anti-OKM1, se demostró que más del 90% de las células son macrófagos. Se colocó 1 ml de medio (1 millón de células) en cada pozo de la caja Falcon y se sometieron a las tres condiciones descritas anteriormente. También se incubaron 20 h, a 37°C, y los sobrenadantes se centrifugaron y se congelaron a -70°C.

Las cajas en cuyos pozos se quedaron adheridos los monocitos de sangre y los macrófagos del calostro también se congelaron, para posteriormente lisarlos. Esto se logró al agregar 1 ml de agua destilada a cada pozo, y al congelar y descongelar ésta 3 veces.

### 3. ENSAYO DE IL-1 ALFA

Se realizó un ensayo de ELISA (ensayo de inmunoabsorbencia asociada a enzimas) para IL-1<sub>α</sub> humana (Endogen IL-1a) con los sobrenadantes de cada condición, y con los monocitos y macrófagos lisados de cada condición, tanto de sangre como de calostro.

Este ensayo de inmunoadsorbencia asociada a enzimas (ELISA) se basa en el principio del "sandwich" inmunométrico de dos anticuerpos: se cubre una inmunoplaaca con anticuerpo monoclonal de ratón específico para IL-1 $\alpha$  humana y los pozos de la placa se incuban con las muestras y controles apropiados. Durante esta incubación, la IL-1 $\alpha$  presente en la muestra se une al anticuerpo (la fase sólida). Todo el material de la muestra que no se adhiere se elimina por aspiración y lavado de los pozos. Después, se añade a los pozos un anticuerpo polivalente de conejo anti-IL-1 $\alpha$  humana, el cual reconoce numerosos epítopes de la misma; el anticuerpo de conejo que no se une se elimina por aspiración y lavado. En seguida se incuban los pozos con un tercer anticuerpo de cabra anti-conejo asociado a la enzima fosfatasa alcalina. De nuevo, el anticuerpo no unido se elimina por aspiración y lavado. Finalmente se añade el sustrato de la enzima (para-Nitrofenil fosfato), de manera que el anticuerpo anti-IL-1 $\alpha$  unido a la placa se cuantifica por medio de una reacción enzimática que resulta en un cambio de color capaz de ser detectado mediante un lector de ELISA. La absorbancia medida (o sea, el cambio en color) es proporcional a la concentración de IL-1 $\alpha$  en la muestra. Por medio de una curva estándar, obtenida graficando la absorbancia de muestras de concentración conocida, se obtienen las concentraciones de IL-1 $\alpha$  de las muestras a medir. La sensibilidad de dicho ELISA para IL-1 $\alpha$  es de 50 pg/ml de IL-1 $\alpha$  biológicamente activa.

El procedimiento del ensayo de ELISA fue el siguiente:

a) Sensibilización de la placa: Se diluyeron 150  $\mu$ l (microlitros) de dicho anticuerpo monoclonal en 11.5 ml de un amortiguador de recubrimiento (albúmina) y se colocaron 100  $\mu$ l de esta solución a cada pozo de la inmunoplaaca. Esta se incubó a 37°C toda la noche; después de dicho tiempo, la placa se lavó tres veces con el amortiguador de lavado (PBS y detergente).

b) primera incubación: se añadieron 50  $\mu$ l de solución de bloqueo (albúmina al 0.3%) a cada pozo después de lo cual se añadieron los controles negativos (RPMI), las diluciones standard (6,075 pg/ml, 2,025 pg/ml, 675 pg/ml, 225 pg/ml y 75 pg/ml), y las muestras, todos por duplicado. Se incubó la placa a 37°C toda la noche para obtener una mayor sensibilidad. Se lavó la placa tres veces con el amortiguador de lavado.

c) segunda incubación: se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo polivalente de conejo anti-IL1 $\alpha$  a cada pozo, se incubó la placa a 37°C durante una hora, y se lavó.

d) tercera incubación: se añadieron 100  $\mu$ l. de anticuerpo anti-conejo de cabra unido a fosfatasa alcalina a cada pozo.

e) reacción: se añadieron 100  $\mu$ l. del sustrato para-nitrofenil fosfato (p-NPP) diluído en su amortiguador a cada pozo. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Se hicieron lecturas en un lector de ELISA a 405 nm durante 6 intervalos de 15 minutos.

Los resultados para cada muestra, obtenidos en unidades de densidad óptica, se extrapolaron a la curva estándar (obtenida por las lecturas de los estándares de IL-1<sub>a</sub> de concentración conocida), por medio de un programa de computación llamado Skansoft. De esta manera se obtuvo la concentración de IL-1<sub>a</sub> en picogramos/ml de cada muestra.

#### 4. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Con los datos obtenidos, se realizó una prueba de t pareada de Student para comparar todas las condiciones entre sí, tanto de sangre como de calostro.

Se aplicó además un análisis de regresión simple entre variables con el objetivo de saber si la producción de IL-1<sub>a</sub> a nivel individual guarda proporción o no ante los distintos estímulos.

El nivel de alfa ( $\alpha$ ) se fijó en 0.05; sin embargo, debido al tamaño relativamente pequeño de la muestra, se consideró que aquellos valores de p entre 0.05 y 0.1 podrían ser significativos si la muestra fuera mayor.

## **IV. RESULTADOS**

La edad promedio de las catorce mujeres puérperas estudiadas fue de 24.7 años. De las catorce, 9 tuvieron parto normal y 5 tuvieron cesárea. Para siete de las pacientes, era su primer hijo, para tres era el segundo, para dos era el tercero y para dos era el cuarto.

### **1. Cantidad de células mononucleares (CMN) obtenidas de sangre periférica y de calostro.**

La cantidad de CMN totales obtenidas de 20 ml de sangre varió de 6 a 24 millones de CMN/ml, con una media de  $11.0 \pm 4.0$ .

La cantidad de CMN obtenidas de 5 a 10 ml de calostro varió de 1 a 12 millones de CMN/ml, con una media de  $3.4 \pm 2.7$ . Por medio de un ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal OKM-1, se comprobó que más del 90% de las CMN en el calostro son macrófagos.

### **2. Producción y liberación de IL-1 $\alpha$**

a) En la Tabla VI, se observa la producción y liberación de IL-1 $\alpha$  por parte de los monocitos de sangre periférica y los macrófagos del calostro, bajo las tres condiciones (basal, LPS y sílice).



TABLA VI. PRODUCCION DE IL-1 $\alpha$  (pg/ml, media  $\pm$  error standard)

Condición	Monocitos sangre	Macrófagos calostro	p <sup>1</sup>
<b>BASAL</b>			
liberada	100.2 $\pm$ 19.9	78.1 $\pm$ 11.8	0.058
intracelular	325.4 $\pm$ 137.3	59.4 $\pm$ 7.9	0.067
p <sup>2</sup>	0.087	0.002	
<b>LPS</b>			
liberada	110.3 $\pm$ 29.2	79.9 $\pm$ 12.5	0.178
intracelular	535.9 $\pm$ 194.5	59.8 $\pm$ 7.5	0.028
p <sup>2</sup>	0.027	0.008	
<b>SILJCE</b>			
liberada	317.7 $\pm$ 111.2	72.7 $\pm$ 10.4	0.048
intracelular	304.2 $\pm$ 154.1	58.3 $\pm$ 7.9	0.047
p <sup>2</sup>	0.377	0.002	

p<sup>1</sup> = monocitos vs. macrófagos

p<sup>2</sup> = liberado vs. intracelular

i) En la condición basal se observa que tanto los monocitos de sangre como los macrófagos del calostro liberan IL-1 $\alpha$  al sobrenadante, pero los primeros liberan una cantidad mayor que los segundos.

La IL-1 $\alpha$  intracelular también es mayor en los monocitos de sangre que en los macrófagos del calostro.

Al comparar la IL-1 $\alpha$  liberada con la intracelular, se observa que los monocitos de sangre guardan más IL-1 $\alpha$  de la que liberan, mientras que los macrófagos de calostro tienden a liberar más de la que guardan.

ii) En la condición de estímulo con LPS, de nuevo los monocitos de sangre liberan al medio mayor cantidad de IL-1 $\alpha$  que los macrófagos del calostro, aunque no se alcanza diferencia significativa. Tampoco hay diferencia significativa entre la IL-1 $\alpha$  liberada basalmente y la liberada con LPS, ni para los monocitos ni para los macrófagos.

Al igual que en la condición basal, la IL-1 $\alpha$  intracelular es mayor en los

monocitos de sangre que en los macrófagos del calostro; y los monocitos de sangre guardan más IL-1<sub>e</sub> de la que liberan mientras que los macrófagos de calostro guardan menos IL-1<sub>e</sub> de la que liberan.

La IL-1<sub>e</sub> intracelular en monocitos de sangre estimulados con LPS es mucho mayor que la IL-1<sub>e</sub> intracelular en monocitos basales. En cambio, en los macrófagos del calostro, no hay diferencia entre la IL-1<sub>e</sub> intracelular en la condición basal y con LPS.

iii) En la condición de estímulo con sílice, al igual que en la basal y con LPS, los monocitos liberan más IL-1<sub>e</sub> al medio que los macrófagos del calostro. La IL-1<sub>e</sub> liberada por monocitos bajo estímulo del sílice es mayor que la liberada por los mismos en condición basal y con LPS. En cambio, la IL-1<sub>e</sub> liberada por los macrófagos de calostro con sílice es incluso menor a la liberada por los mismos basalmente o con LPS.

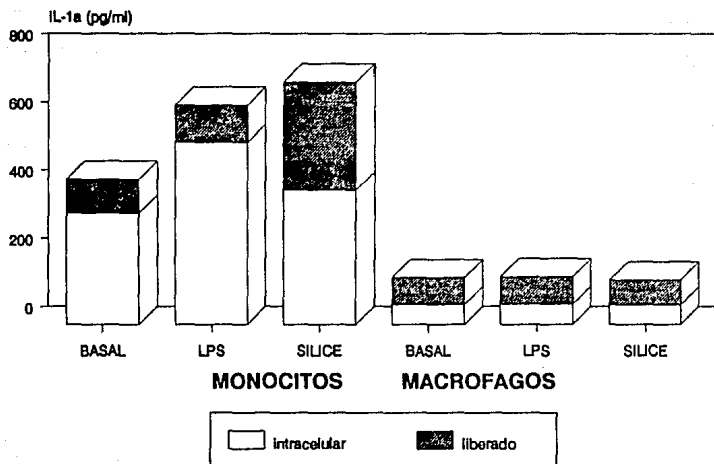
Al igual que en la condición basal y con LPS, bajo el estímulo del sílice, la IL-1<sub>e</sub> intracelular en los monocitos es mayor a la de los macrófagos del calostro. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los monocitos de sangre en la condición basal y con LPS, con sílice éstos no muestran diferencia significativa entre la IL-1<sub>e</sub> liberada y la IL-1<sub>e</sub> intracelular. En cambio, los macrófagos de calostro siguen liberando más de lo que guardan.

La cantidad de IL-1<sub>e</sub> intracelular de monocitos estimulados con sílice, es parecida a la condición basal y algo menor que la condición de estímulo con LPS. En los macrófagos del calostro no hay diferencia entre la cantidad de IL-1<sub>e</sub> intracelular en la condición con sílice y en la basal o con LPS.

#### b) Producción total de IL-1<sub>e</sub>:

Al sumar la IL-1<sub>e</sub> liberada al sobrenadante y la IL-1<sub>e</sub> intracelular, se obtiene la producción total de IL-1<sub>e</sub> en cada condición (figura 3), para los monocitos y para los macrófagos.

**Figura 3**  
**PRODUCCION TOTAL DE IL-1 ALFA**



Existe una marcada diferencia entre la producción total de IL-1 $\alpha$  por los monocitos de sangre y por los macrófagos del calostro en las tres condiciones: basal ( $425.52 \pm 153.85$  vs  $137.44 \pm 19.22$  pg/ml,  $p=0.062$ ); LPS ( $644.25 \pm 219.74$  vs  $139.7714 \pm 19.52$  pg/ml,  $p=0.033$ ) y sílice ( $711.95 \pm 255.42$  vs  $130.98 \pm 18.20$  pg/ml,  $p=0.039$ ).

En la figura 3 se observa que, en respuesta al LPS y al sílice, los monocitos de sangre muestran un aumento notable en la producción total de IL-1 $\alpha$  con respecto a su condición basal ( $p=0.052$  para la primera,  $p=0.15$  para la segunda). En cambio, los macrófagos de calostro, al ser estimulados con LPS, no muestran un aumento en la producción total de IL-1 $\alpha$  con respecto a su condición basal ( $p=0.313$ ), e incluso muestran una disminución del 5% en la misma cuando son estimulados con sílice ( $p=0.032$ ).

#### c) Presencia de IL-1 $\alpha$ en el sobrenadante del calostro

Puesto que los macrófagos pudieran estar liberando IL-1 $\alpha$  al calostro de manera constitutiva, se buscó IL-1 $\alpha$  en el sobrenadante (filtrado) del mismo en 6 casos (Tabla VII). Con excepción de un caso, la IL-1 $\alpha$  presente en el sobrenadante del calostro fue igual o menor que la liberada por los macrófagos en la condición basal.

TABLA VII. ACTIVIDAD DE IL-1  $\alpha$  EN CALOSTRO (pg/ml)

Núm. pec.	sobrenadante	Macrófagos		
		basal	LPS	Sílice
50	21.6	30.6	31.9	26.8 (a)
		26.2	27.9	20.5 (b)
51	24.3	28.8	28.1	26.0
		19.2	18.6	19.5
52	23.1	27.1	27.3	27.5
		20.2	22.7	21.4
53	28.7	37.5	39.5	37.4
		34.5	34.8	29.0
54	245.4	37.9	36.1	36.2
		31.4	38.1	32.1
55	30.9	37.9	36.2	33.7
		29.2	33.7	31.1

(a) IL-1 $\alpha$  liberada- regiones nores

(b) IL-1 $\alpha$  intracelular- regiones pares

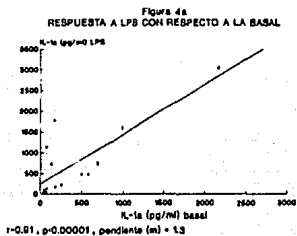
### 3. Regresiones simples.

a) Debido a la alta dispersión de los datos obtenida en monocitos de sangre, se realizó una prueba de regresión simple para saber si la respuesta de los monocitos y los macrófagos, ante ambos estímulos (LPS y Si) es proporcional o no a nivel individual. En otras palabras, para saber si los monocitos o macrófagos que liberan altas cantidades de IL-1<sub>a</sub> en la condición basal también liberan altas cantidades de la misma bajo estímulo de LPS o sílice, y viceversa.

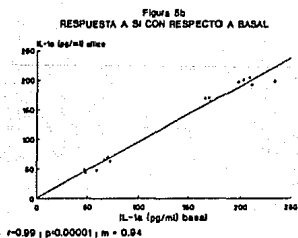
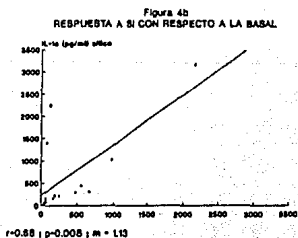
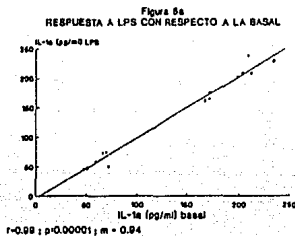
Encontramos una correlación positiva entre la liberación de IL-1<sub>a</sub> por los monocitos de sangre en condición basal y la IL-1<sub>a</sub> liberada tanto con LPS como con sílice ( $r=0.85$ ,  $p<0.00001$  y  $r=0.64$ ,  $p=0.011$  respectivamente). La IL-1<sub>a</sub> intracelular basal en los monocitos de sangre también es proporcional a la IL-1<sub>a</sub> intracelular en los mismos estimulados con LPS o sílice ( $r=0.89$ ,  $p<0.00001$  y  $r=0.80$ ,  $p=0.0003$ , respectivamente). Así mismo, la producción total de IL-1<sub>a</sub> por los monocitos de sangre en la condición basal es proporcional a la producción total de la misma bajo estímulo de LPS o sílice ( $r=0.91$ ,  $p<0.00001$  y  $r=0.68$ ,  $p=0.0075$ , figura 4a y 4b respectivamente).

Lo mismo sucede con los macrófagos del calostro. La liberación de IL-1<sub>a</sub> en la condición basal es proporcional a la liberada con LPS o sílice ( $r=0.99$ ,  $p<0.00001$  y  $r=0.98$ ,  $p<0.00001$ , respectivamente), y la IL-1<sub>a</sub> intracelular en la condición basal es proporcional a la IL-1<sub>a</sub> intracelular con LPS o sílice ( $r=0.99$ ,  $p<0.00001$  y  $r=0.98$ ,  $p<0.00001$ , respectivamente). Así mismo, la producción total de IL-1<sub>a</sub> por los macrófagos del calostro en la condición basal es proporcional a la producción total de la misma con LPS y sílice ( $r=0.99$ ,  $p<0.00001$  y  $r=0.99$ ,  $p<0.00001$ , figura 5a y 5b respectivamente).

PRODUCCION TOTAL DE IL-1 ALFA POR  
MONOCITOS DE SANGRE: RESPUESTA A LPS Y SILICE



PRODUCCION TOTAL DE IL-1 ALFA POR  
MACROFAGOS DEL CALOSTRO: RESPUESTA A LPS  
SILICE



b) Puesto que el tiempo de puerperio pudiera influir sobre la concentración de macrófagos por mililitro de calostro obtenidos en cada muestra, se hizo una regresión entre dichas variables (número de macrófagos del calostro/ml y tiempo de puerperio). No se encontró correlación.

Tampoco se encontró correlación entre la IL-1 $\alpha$  liberada por o la intracelular en los macrófagos del calostro y las horas de puerperio, en ninguna de las tres condiciones.

c) Finalmente, se encontró una relación negativa entre la producción total de IL-1 $\alpha$  por los macrófagos del calostro (a 1 millón/ml) y el número total de macrófagos/ml obtenido de cada muestra, para las tres condiciones: basal ( $r=-0.66$ ,  $p=0.01$  figura 6a), LPS ( $r=-0.65$ ,  $p=0.01$  figura 6b) y slice ( $r=-0.68$ ,  $p=0.007$  figura 6c).

Sin embargo, no se encontró dicha relación para los monocitos de sangre periférica.

RELACION ENTRE NUMERO DE MACROFAGOS /ml EN EL CALOSTRO Y PRODUCCION TOTAL DE IL-1 ALFA POR LOS MISMOS

Figura 6a  
CONDICION BASAL

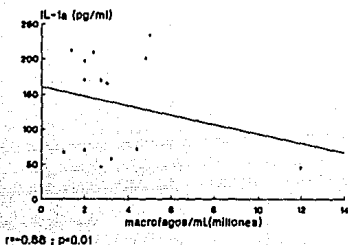


Figura 6b  
CONDICION CON LPS

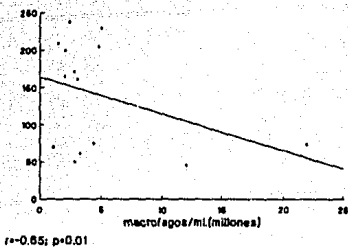
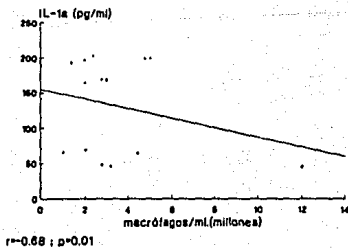


Figura 6c  
CONDICION CON SILICE





## **V. DISCUSION**

Se aprecia un aumento notable en la producción total de IL-1 $\alpha$  por monocitos de sangre periférica en respuesta a los estímulos de LPS y de sílice. A diferencia de lo que podría pensarse en un principio, en la condición basal hay una producción total considerable de IL-1 $\alpha$ , la mayoría de la cual es IL-1 $\alpha$  intracelular. Este hecho coincide con el trabajo de Lepe-Zuñiga *et al* (38) en el cual reporta que en los monocitos de sangre no estimulados existe una reserva de IL-1 intracelular (la cual corresponde casi por completo a IL-1 $\alpha$ ).

El aumento en la producción total de IL-1 $\alpha$  por los monocitos de sangre estimulados con LPS se debe a un aumento marcado en la IL-1 $\alpha$  intracelular, puesto que la IL-1 $\alpha$  secretada no aumenta con respecto a la basal. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Lonemann *et al* (39), en el que se demuestra que en monocitos estimulados con LPS, el 80% de la IL-1 $\alpha$  permanece asociada a la célula durante las primeras 24 horas de estimulación. Efectivamente, en los monocitos estimulados con LPS, la IL-1 $\alpha$  intracelular (520 pg/ml) resulta ser el 81% de la IL-1 $\alpha$  total (642 pg/ml). La IL-1 $\alpha$  intracelular que se midió incluye a la IL-1 $\alpha$  membranal, puesto que el lisado celular tiene restos de la membrana plasmática.

En cambio, en los monocitos estimulados con sílice, el aumento en la producción total de IL-1 $\alpha$  se debe a un aumento en la IL-1 $\alpha$  secretada y no a un aumento en la IL-1 $\alpha$  intracelular. Esto se debe a que el sílice daña al

macrófago y por lo tanto provoca la liberación de IL-1 $\alpha$  intracelular. Este aumento en IL-1 extracelular al incubar monocitos de sangre periférica con sílice o con ésteres de forbol, fue descrito por Lape-Zuñiga *et al* (30).

El que no se haya alcanzado diferencia significativa entre la producción total de IL-1 $\alpha$  por monocitos en la condición basal y en la condición con sílice, a pesar de ser tan distintos los valores medios, se debe a la alta dispersión de los datos obtenida para estos. Es por esto que se estudió a nivel individual cómo estaban respondiendo los monocitos a los estímulos. El análisis de regresión simple muestra que la respuesta a nivel individual ante cualquiera de los dos estímulos (LPS y Si) es proporcional a la producción basal, tanto para la IL-1 intracelular como para la secretada. Es decir, que los monocitos con una alta producción de IL-1 $\alpha$  en la condición basal, también tienen una alta producción de la misma ante LPS o sílice, y viceversa. Las regresiones para la producción total ante ambos estímulos (figuras 4a y 4b) dan rectas con pendiente mayor de uno, lo cual indica que la producción de IL-1 $\alpha$  en respuesta a LPS o al sílice es mayor que la basal y que, por lo tanto, los monocitos están respondiendo a estos estímulos.

Los datos de los monocitos de sangre contrastan con los datos de los macrófagos del calostro. En primer lugar, de acuerdo a lo reportado por Subiza *et al* (93), la producción total de IL-1 $\alpha$  por los macrófagos es varios órdenes de magnitud menor a la de los monocitos para las tres condiciones, y no hay diferencia entre la producción total de IL-1 $\alpha$  por los macrófagos en la condición

basal, con LPS y con sílice. Incluso se observa una disminución en la producción total de IL-1 $\alpha$  en respuesta al sílice. Al igual que los monocitos de sangre, a nivel individual la producción de IL-1 $\alpha$  ante LPS y sílice es proporcional a la producción basal, tanto para la IL-1 $\alpha$  intracelular como para la secretada. Pero, a diferencia de los monocitos, las rectas obtenidas al relacionar la producción total de IL-1 $\alpha$  con LPS y con Si con respecto a la basal (figura 5a y 5b) tienen una pendiente igual a uno. Esto indica que los macrófagos no están respondiendo a ninguno de los dos estímulos, sino que siguen produciendo lo mismo que producían basalmente.

En segundo lugar, la cinética de producción y liberación de IL-1 $\alpha$  por los macrófagos es distinta. A diferencia de lo que pasa en los monocitos de sangre, la IL-1 $\alpha$  intracelular no aumenta en respuesta al estímulo con LPS, y la IL-1 $\alpha$  extracelular tampoco aumenta en respuesta al sílice (incluso disminuye). Lo primero sugiere que el macrófago no tiene capacidad de aumentar su producción de IL-1 $\alpha$  como respuesta ante estímulos antigénicos. Lo segundo sugiere que, por alguna razón, el sílice no está dañando al macrófago del calostro lo suficiente como para que éste libere su IL-1 $\alpha$  intracelular.

Subiza *et al* (93) plantean que los macrófagos del calostro son incapaces de liberar la IL-1 que han producido. Sin embargo, los resultados que obtuvimos indican que la baja cantidad total de IL-1 $\alpha$  producida por los macrófagos del calostro radica en una inhibición de la producción misma más que en un

problema de liberación, puesto que los macrófagos liberan más IL-1 $\alpha$  de la que guardan intracelularmente.

Debido a que ambas IL-1 son reguladas a nivel de transcripción y traducción, sería interesante estudiar los niveles de ARNm para IL-1 $\alpha$  en macrófagos de calostro, para determinar si los bajos niveles de IL-1 $\alpha$  se deben a una menor velocidad en la transcripción del gen, o a una menor velocidad de traducción del mismo.

La limitación que tienen los macrófagos en la producción de IL-1 $\alpha$ , y la falta de respuesta de éstos ante estímulos como LPS o slica puede deberse a varias razones:

a) A que los macrófagos, *in vivo*, estuvieran produciendo IL-1 $\alpha$  de manera constitutiva, lo cual *in vitro* resultaría en bajas cantidades de IL-1 $\alpha$  debido a un "agotamiento celular." Se ha encontrado que existe una subpoblación de monocitos de sangre que secretan IL-1 de manera constitutiva (94) y Koretzky *et al* (95) encuentran lo mismo para macrófagos alveolares. Si esto fuera así para los macrófagos del calostro, la cantidad de IL-1 $\alpha$  en el sobrenadante del mismo sería elevada. Sin embargo, en cinco de seis púerperas, la cantidad de IL-1 $\alpha$  medida en el sobrenadante del calostro es incluso menor a la cantidad liberada por los macrófagos en condición basal, lo cual sugiere que la idea del agotamiento celular es poco probable.

b) Podrían existir factores inhibitorios del macrófago en el calostro. Se sabe que por ejemplo las prostaglandinas inhiben la producción de IL-1. Subiza *et al* inhibieron la síntesis de prostaglandinas por medio de indometacina, y no observaron diferencia en la producción de IL-1 por los macrófagos del calostro. Sin embargo, es importante señalar que Ogra (85), encuentra que calostro libre de células inhibe la respuesta de linfocitos de sangre periférica y de calostro a fitohemaglutinina (PHA), lo cual sugiere la existencia de un inhibidor de células T en el calostro y la leche. Por lo tanto, no se puede descartar completamente la idea de un (o unos) factor(es) soluble(s) inhibidor(es) de macrófagos presente(s) en el calostro. Se ha encontrado que anticuerpos anti-Ia inhiben la secreción espontánea de IL-1 por macrófagos alveolares de ratas tratadas con sílice (96), por lo que sería interesante buscar la presencia de dichos anticuerpos en el calostro.

Por otro lado, el hecho de que encontramos una relación negativa entre la concentración de macrófagos/ml en el calostro de cada mujer puerpera y la producción de IL-1<sub>α</sub> en cualquiera de las tres condiciones, podría sugerir algún mecanismo regulatorio denso-dependiente. Podría tratarse de alguna sustancia inhibitoria de macrófagos, producida por los mismos de manera proporcional a su densidad.

c) El hecho de que sean células diferenciadas podría también explicar la

deficiencia en la producción de IL-1. Se ha sugerido que esta deficiencia pueda ser común a todos los macrófagos tisulares. El único otro macrófago de humano en el que se ha estudiado producción de IL-1 es el macrófago alveolar. En un estudio hecho por Wewers *et al* (97), se encontró que el macrófago alveolar de humano es 1,000 veces menos sensible al LPS que el monocito de sangre, y que, aunque capaz de liberar IL-1, lo hace en menor cantidad que los monocitos. Por otro lado, un trabajo realizado por Koretzky *et al* (95) reporta la liberación constitutiva de IL-1 por macrófagos alveolares, lo cual no sucede con los macrófagos del calostro. Por lo tanto, no se puede asegurar que la menor producción de IL-1 sea una característica común a todos los macrófagos tisulares.

d) Por último, la menor producción de IL-1 podría ser una característica propia de los macrófagos de calostro. La siguiente pregunta sería entonces por qué los macrófagos de calostro están "programados" para producir cantidades tan bajas de IL-1? Hay que recordar que la IL-1 es una interleuquina responsable de generar una gran variedad de efectos como fiebre e inflamación, por lo que la capacidad limitada de producción de IL-1 por los macrófagos del calostro podría reflejar un papel de protección hacia el neonato. Es decir, si los macrófagos del calostro produjeran las cantidades de IL-1 que producen los monocitos de sangre periférica, quizás podrían suscitar en el neonato toda una serie de reacciones fisiológicas (fiebre, inflamación, etc.) no deseadas. De hecho,

una de las características protectoras de la leche humana es la de prevenir respuestas inflamatorias que puedan dañar el tejido blanco del neonato (86). Esta posible acción anti-inflamatoria de la leche humana es apoyada por la escasez de mediadores de inflamación y la abundancia de agentes antiflogísticos en la misma (98). Por ejemplo, no hay IgE, basófilos, células cebadas y eosinófilos (todos ellos implicados en reacciones de hipersensibilidad) en la leche humana, mientras que sí hay antiproteasas, antioxidantes, enzimas que degradan mediadores inflamatorios e inhibidores de leucocitos. Se ha encontrado que en el intestino delgado la IL-1 estimula liberación de PGE2 por parte del subepitelio intestinal, elevación en el AMPc, secreción de agua y electrolitos, y que niveles altos de esta citocina en el intestino está asociada a procesos inflamatorios, de diarrea y de degeneración tisular (99).

Por otro lado, aproximadamente el 50% de cepas de *E coli* que causan infecciones extraintestinales, produce una de las toxinas bacterianas más frecuentemente encontrada en humanos, llamada la hemolisina (100). Se ha observado que dicha toxina no sólo tiene efecto citocida sobre células monocíticas, sino que, a dosis bajas, es capaz de inducir una liberación rápida de grandes cantidades de IL-1 por parte de los mismos (101). Debido a que *E coli* es una bacteria comunmente encontrada en el intestino tanto en neonatos como adultos, el hecho de que los macrófagos del calostro estén inhibidos en su producción y liberación de IL-1 puede también representar un mecanismo de



defensa contra el efecto de la hemolisina producida por las cepas patógenas de *E. coli*.

Finalmente, es interesante el hecho de que los macrófagos de calostro sometidos al silice, cuyo efecto podría ser comparable al de los jugos gástricos del neonato, no hayan liberado la IL-1a intracelular, a diferencia de lo que pasa con los monocitos de sangre. Esta probable "resistencia" al daño celular provocado por el silice por parte del macrófago del calostro, podría reflejar otro mecanismo de protección contra inflamación en el neonato. Esto de nuevo sugiere que los macrófagos del calostro poseen características únicas, diferentes a los demás macrófagos tisulares. Esto no sería raro, pues es un hecho aceptado el que existen pequeñas diferencias morfológicas y funcionales entre macrófagos según su localización y función (102).

A pesar de la marcada disminución en su capacidad de producir IL-1a, existe la posibilidad de que las cantidades de IL-1 producidas por los macrófagos del calostro sean suficientes para ayudar a estimular los macrófagos y linfocitos presentes en el subepitelio intestinal del neonato, sin generar respuesta a nivel fisiológico; sobretodo si consideramos que la IL-1 membranar (de la cual prácticamente toda es IL-1a) es la responsable de la activación de células T por medio de la interacción celular entre éstas y los macrófagos.

O bien, podría ser que sencillamente la producción de IL-1 no es una

función de los macrófagos del calostro. El hecho de que se ha encontrado IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en líquido amniótico (103), así como producción de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por monocitos del cordón umbilical en cantidades comparables a la de los monocitos de adulto (104,105), sugiere que desde el estado fetal ya hay producción de dicha interleuquina y que por lo tanto no es necesaria su transmisión pasiva por los macrófagos del calostro. Otras moléculas como el TNF $\alpha$ , con funciones similares en la activación de la respuesta inmune pero sin efectos a nivel fisiológico, podrían ser producidas por los macrófagos del calostro. De hecho, en este estudio también se midió producción y liberación de TNF $\alpha$  en tres casos, mediante un ELISA (Biokine). Los resultados, aunque poco significativos por el tamaño de la muestra, parecen indicar que, efectivamente, en los macrófagos del calostro estimulados con LPS o sílice las cantidades de TNF $\alpha$  liberado e intracelular tienden a ser mayores que las de IL-1 $\alpha$ , y que los macrófagos del calostro incluso tienen más TNF $\alpha$  intracelular que los monocitos de sangre en las tres condiciones.

Se sabe poco sobre el destino *in vivo* de los componentes inmunológicos de la leche humana, sobretodo con respecto a la parte celular, pero independientemente de su función en cuanto a la aportación de IL-1, es muy probable que los macrófagos de calostro estén cumpliendo con otras funciones importantes en la maduración del sistema inmune gastrointestinal del recién nacido. El hecho de que el neonato posea un sistema inmune inmaduro está

apoyado por varios trabajos. Los monocitos de los neonatos poseen menor capacidad fagocítica (106), actividad quimiotáctica (107) y actividad microbicida (108,109) que en los adultos. Así mismo, se ha visto que el neonato no puede producir y mandar números adecuados de fagocitos a los sitios de infección (110). Por lo tanto, a partir del hecho de que el macrófago del calostro es estable en el ambiente gástrico y que puede penetrar la mucosa intestinal del neonato (111), éste podría estar compensando dichas deficiencias hasta que el sistema inmune gastrointestinal del neonato madure.

Finalmente, está comprobada la idea de que los linfocitos B y T del calostro y la leche, que van a dar al tracto gastrointestinal del neonato, provienen de las placas de Peyer del intestino de la madre (77), lo cual explicaría que la especificidad antigénica de la IgA de la leche esté en gran parte dirigida contra antígenos microbianos presentes en el tracto gastrointestinal de la madre. Se ha sugerido incluso la transferencia de inmunidad celular de la madre al neonato, vía linfocitos T del calostro y leche (111,112), aunque todavía no está totalmente comprobado que dichas células sean absorbidas intactas por el neonato. Podría especularse que, de manera parecida, los macrófagos de la leche provienen de las placas de Peyer del intestino de la madre, y que al llegar al intestino del neonato, además de llevar a cabo las funciones ya mencionadas en el intestino del neonato, pudieran transferirle información sobre la flora gastrointestinal.

## VI. CONCLUSION

En comparación con los monocitos de sangre, que responden a los estímulos de LPS y sílice con un aumento marcado en la producción total de IL-1 $\alpha$ , los macrófagos del calostro producen IL-1 $\alpha$  en cantidades mucho menores y poseen una marcada incapacidad para aumentar la producción de la misma en respuesta a los mismos estímulos. Es muy posible que esta deficiencia se deba, más que a factores inhibidores en el calostro o a que son macrófagos diferenciados, a que es una forma de proteger al neonato de los efectos fisiológicos (fiebre e inflamación) causados por altas cantidades de IL-1. Esto es apoyado por el hecho de que la transmisión pasiva de inmunidad vía calostro y leche es un mecanismo preciso y programado, y que varía de una especie a otra. Se sabe que por ejemplo la cantidad y tipo de inmunoglobulinas secretada por la glándula mamaria varía a lo largo de la lactancia y que es inversamente proporcional a la cantidad y tipo de inmunoglobulinas en el neonato, y directamente proporcional a la capacidad de absorción de las mismas por el intestino del recién nacido. Esta extraordinaria coordinación entre lo aportado por la madre y lo requerido por el neonato, por lo tanto, parece ser extensiva a otros productos de secreción de la glándula mamaria como por ejemplo la IL-

1.

Las bajas cantidades de IL-1<sub>a</sub> producidas por los macrófagos podrían ser suficientes para estimular de manera directa a los linfocitos T del subepitelio intestinal del neonato sin causar fiebre, inflamación o diarrea. O bien, podría ser que el neonato no requiera de la transmisión pasiva de IL-1 por los macrófagos del calostro. Independientemente de su producción de IL-1, los macrófagos del calostro, junto con todos los demás componentes inmunológicos de la leche, parecen tener una función muy importante en la transmisión pasiva de inmunidad y en la maduración del sistema inmune del neonato.

## VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Dumonde, D.C., R.A. Wolstencroft, G. Payani, *et al* 1969. Natura 224:8 en (6).
2. Waksman, B.H. 1979. in Cohen, S., E. Pick, J. Oppenheim (eds) Biology of the Lymphokines. Academic Press, NY, p.259.
3. Bloom, B.R. 1966. Science, 153:180 en (6).
4. Cohen, S. *et al* 1977. Cell Immunol 33:233 en (6).
5. Aarden, L.A. 1979. J Immunol 123:2928 en (6).
6. Hamblin, S.A. 1988. Lymphokines, D. Male, D. Rickwood (eds), IRL Press Limited, UK, 71 pp.
7. Sanderson, C.J., H.D. Campbell, I.G. Young. 1988. Immunol Rev en (6).
8. Brodsky, F.M. 1984. Immunol Today 5:350 en (6).
9. Spits, H., H. Yssel, Y. Takebe, *et al*. 1987. J Immunol 139:1142 en (6).
10. Duram, S.K., J.A. Schmidt, J. Oppenheim. 1985. Ann Rev Immunol 3:263 en (6).
11. Atkins, E. 1960. "The pathogenesis of fever" Physiol Rev 40:580 en (22).
12. Dinarello, C.A., L. Renfer, S.M. Wolff. 1977. "Human leukocytic pyrogen and leukocytic endogenous mediator" Proc Soc Exp Biol Med 74:4624.
13. Gery, I., B.H. Waksman. 1972. "Potentiation of the T/lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediators" J Exp Med 136:143.
14. Krane, S.M., J.M. Daye, L.S. Simon, S. Byrne. 1985. "Mononuclear cell-conditioned medium containing mononuclear cell factor (MCF), homologous with interleukin-1, stimulates collagen and fibronectin synthesis by adherent rheumatoid synovial cells: effects of prostaglandin E2 and indomethacin" Collagen Rel Res 5:99 en (22).
15. Saklatvala, J., S.J. Sarsfield, Y. Townsend. 1985. "Pig interleukin-1. Purification of two immunologically different leukocyte proteins that cause cartilage resorption, lymphocyte activation, and fever" J Exp Med 162:1208.
16. Dewhirst, F.E., P. Stashenko, J. Mole, T. Tsurumachi. 1985. "Purification and partial sequence of human osteoclast/activating factor: identity with interleukin-1 beta" J Immunol 135:2562.
17. Moore, M., D. Warren. 1987. "Synergy of interleukin-1 and granulocyte colony-stimulating factor: *in vivo* stimulation of stem-cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice" Proc Natl Acad Sci USA 84:7134.
18. Clark, B.D., K.L. Collins, M. Gancy, *et al* 1986. "Genomic sequence for human prointerleukin-1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin-1 alpha gene" Nucleic Acids Res 14:7897.

19. Furutani, Y., M. Notaka, M. Yamayoshi, et al 1985. "Cloning and characterization of the cDNAs for human and rabbit interleukin-1 precursor" Nucleic Acids Res 13:5869.
20. Lomedico, P.T., U. Gubler, S.B. Mizel 1987. Lymphokines 13:139 en (6).
21. Demeczuk, S., D. Baumberger, B. Mach, J.M. Dayer. 1987. "Expression of human IL-1 alpha and beta messenger RNAs and IL-1 activity in human peripheral blood mononuclear cells" J Mol Cell Immunol 3:255.
22. Dinarello, C.A., N. Savage. 1989. "IL-1 and its receptor" Crit Rev Immunol 9:1.
23. Killan, P.L. 1986. "IL-1 alpha and beta bind to the receptor on T cells" J Immunol 136:4509.
24. MacDonald, H.R., P. Wingfield, U. Schmeissner, et al 1986. "Point mutations of human interleukin-1 with decreased receptor binding affinity" FEBS Lett, 209:295 en (22).
25. Ikejima, T., S.F. Orencole, S.J. Warner, C.A. Dinarello. 1987. "TSST-1 resistance in mice is related to interleukin-1 production" J Leuk Biol 42:561 en (22).
26. Fenton, M.T., B. Clark, K. Collins, et al 1987. "Transcriptional regulation of the human prointerleukin-1 beta gene" J Immunol 138:3972.
27. Knudsen, P.J., C.A. Dinarello, T. Strom. 1986. "Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate" J Immunol 132:3189.
28. Knudsen, P.J., C.A. Dinarello, T. Strom. 1987. "Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells" J Immunol 139:4129.
29. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, W. Fiers. 1985. J Immunol 134:2444 en (6).
30. Lepe-Zúñiga, J.L. I. Gery. 1984. "Production of intracellular and extracellular interleukin-1 (IL-1) by human monocytes" Clin Immunol Immunopath 31:222.
31. Kurt-Jones, E., J. Kiely, E.R. Unanue. 1985. "Conditions required for expression of membrane IL-1 on B cells" J Immunol 135:1548.
32. Beuscher, H., R. Fallon, H. Colten. 1987. "Macrophage membrane interleukin 1 regulates the expression of acute phase proteins in human hepatoma Hep 3B cells" J Immunol 139:1896.
33. Auron, P., S. Warner, A. Webb, J. Cannon, H. Bernheim, K. McAdam, L. Rosenwasser, G. LoPreste, S. Mucci, C. Dinarello. 1987. "Studies on the molecular nature of human interleukin-1" J Immunol 138:3403.
34. Matsushima, K., M. Taguchi, E. Kovacs, H. Young, J. Oppenheim. 1986. "Intracellular localization of human monocyte associated IL-1 activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin" J Immunol 136:2883.
35. Kurt-Jones, E., D. Beller, S. Mizel, E.R. Unanue. 1985. "Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages" Proc Natl Acad Sci USA 82:1204.



36. Weaver, C., E. Unanue. 1987. 'T cell induction of membrane IL-1 on macrophages' J Immunol 137:3868
37. Conlon, P., K. Grabstein, A. Alpert, K. Prickett, T. Hopp, S. Gillis. 1987. 'Localization of human mononuclear cell Interleukin 1' J Immunol 139:98.
38. Lape-Zúñiga, J. L., J. S. Ziegler, M. Zimmerman, I. Gery. 1985. 'Differences between intra and extracellular IL-1' Mol Immunol 22:1387.
39. Lonnemann, G., S. Endres, J. Van der Meer, J. Cannon, K. Koch, C. Dinarello. 1989. 'Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1a, interleukin 1b and tumor necrosis factor from human mononuclear cells' Eur J Immunol 9:1531.
40. Scarborough, D., C. A. Dinarello, S. Reichlin. 1987. 'Recombinant human interleukin-1 beta increases somatostatin in fetal rat hypothalamic neurons *in vitro*' J Leuk Biol 42:560 en (22).
41. Mandrop-Poulsen, T., K. Bendtzen, J. Nerup, C. Dinarello, M. Svenson, J. Nielson. 1988. 'Affinity purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans' Diabetologia 29:63 en (22).
42. McCarthy, D., M. Kluger, A. Vander. 1987. 'Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved' Am J Clin Nutr 42:1179 en (22).
43. Matsushima, K., J. Yodoi, Y. Tagaya, J. Oppenheim. 1988. 'Down regulation of interleukin-1 receptor expression by IL-1 and fate of internalized 125-I labeled IL-1-beta in a human large granular lymphocyte cell line' J Immunol 137:3183.
44. Dejana, E., F. Brevario, A. Errol, F. Bussolino, L. Mussoni, M. Bramsa, G. Fintucci, B. Casali, C. Dinarello, J. Van Damme, A. Mantovani. 1987. 'Modulation of endothelial cell function by different molecular species of interleukin-1' Blood 69:695 en (22).
45. Bevilacqua, M. P., J. Pober, G. Majeau, R. Cotran, M. Gimbrone. 1984. 'Interleukin-1 induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity on human vascular endothelial cells' J Exp Med 160:618.
46. Johnston, R. 1988. 'Monocytes and macrophages' N Eng J Med 318:747.
47. Nichols, B., D. Bainton, M. Farquhar. 1971. 'Differentiation of monocytes: origin, nature and fate of their azurophil granules' J Cell Biol 50:498.
48. Huber, H., M. Polley, M. Linscott. 1968. 'Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G' Science 162:1231 en (46).
49. Schwartz, R., A. Bioanco, B. Handweger. 1975. 'Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: implications for studies of insulin-resistant states in man', Proc Natl Acad Sci USA 72:474.
50. Van Furth, R., J. Raeburn, T. Van Zweet. 1979. 'Characteristics of human mononuclear phagocytes' Blood 54:485 in Lassar, A. 1983. 'The Mononuclear Phagocytic System: A Review' Human Pathology 14:108.

51. Rhodes, J. 1975. "Macrophage heterogeneity in receptor activity: the activation of macrophage Fc receptor function *in vivo* and *in vitro*" J Immunol 114:976.
52. Diamond, B., D. Yelton. 1981. "A new Fc receptor on mouse macrophages" J Exp Med 153:514.
53. Anderson, C., H. Spiegelberg. 1981. "Macrophage receptors for IgE: binding of IgE to specific IgE receptors on a human macrophage cell line, U937" J Immunol 126:2470.
54. Griffin, F.M., C. Bianco, S.C. Silverstein. 1975. "Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration for its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G" J Exp Med 141:1269.
55. Schwartz, R., H. Dickler, D. Sachs. 1976. "Studies of Ia antigens on murine peritoneal macrophages" Scand J Immunol 5:731 en (46).
56. Cowing, C., B. Schwartz, H. Dickler. 1978. "Macrophage Ia antigens. I. Macrophage populations differ in their expression of Ia antigens" J Immunol 120:378.
57. Beller, D., E.R. Unanue. 1981. "Regulation of macrophage populations. II. Synthesis and expression of Ia antigens by peritoneal exudate macrophage is a transient event" J Immunol 126:263.
58. Nathan, C., H. Murray, Z. Cohn. 1980. "The macrophage as an effector cell" N Engl J Med 303:622.
59. Unkeless, J., S. Gordon, E. Reich. 1974. "Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages" J Exp Med 139:834.
60. Candella, C., P. Davies, A. Allison. 1974. "Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages" Nature 247:46.
61. Pantalone, R., R. Page. 1975. "Lymphokine induced production and release of lysosomal enzymes by macrophages" Proc Natl Acad Sci USA 72:2091.
62. Gurie, G. 1978. "Activated macrophages kill tumorous cells by releasing arginase" Nature 273:758.
63. Beatty, D., A. Davis, F. Cole. 1981. "Biosynthesis of complement by human monocytes" Clin Immunol Immunopathol. 18:334.
64. Schorlemmer, H., P. Davies, A. Allison. 1976. "Ability of activated complement components to induce lysosomal enzyme release from macrophages" Nature 261:48.
65. Weiss, S., G. King, A. Lo Bugho. 1977. "Evidence for hydroxyl radical generation by human monocytes" J Clin Invest. 60:370.
66. Johnston, R., C. Godzik, Z. Cohn. 1978. "Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages" J Exp Med 148:115.
67. Kurland, J.L., R. Bockman. 1978. "Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages." J Exp Med 147:952.

68. Rouzer, C., W.Scott, A.Hamill. 1980. "Dynamics of leukotriene C production by macrophages" J Exp Med 152:1236 en Lasser, A. 1983. Human Pathology 14:108.
69. Cline, M. 1978. Monocytes, macrophages and their diseases in man. J Invest Dermatol 71:56 en Lasser, A. 1983. Human Pathology 14:108.
70. Unanue, E. 1980. "Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity" N Eng J Med 303:977.
71. Pimstone, N., R.Tenhunen, P.Seitz. 1971. "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." J Exp Med 133:1264.
72. Beutler, B., A.Ceramli. 1987. "Cachectin: more than a tumor necrosis factor" N Engl J Med 316:379.
73. Metcalf, D., G.Johnson, A.Burgess. 1980. "Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells" Blood 55:138.
74. Rich, I., B.Kubaneck. 1982. J Reticuloendoth Soc 31:17 en (46).
75. Jacobs, A., M.Worwood. 1975. "Ferritin in serum" N Eng J Med 292:951.
76. Rachmulewitz, B., M.Rachmulewitz, M.Chaovat. 1978. "Production of TCH (vitamin B 12 transport protein) by mouse mononuclear phagocytes" Blood 52:1089 en Lasser, A. 1983. Human Pathology 14:108.
77. Goldman, A.S., R.M.Goldblum. 1989. "Immunologic system in human milk: characteristics and effects" in E.Lebenthal (ed) Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy, Raven Press, LTD, NY, p.135-142.
78. Gyorgy, P. R.Jeanloz, H.von Nicolai, F.Zilliken. 1974. "Undialyzable growth factors for Lactobacillus bifidus var. pennsylvanicus" Eur J Biochem 43:29.
79. Holmgren, J., A.Swernerholm, C.Ahren. 1981. "Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of Escherichia coli and Vibrio cholerae" Infect Immun 33:136.
80. Gillin, F.D., D.S.Reiner, C.S.Wang. 1983. "Human milk kills parasitic protozoa" Science 221:1290.
81. Goldblum, R.M., S.Ahstedt, B.Carlson. 1975. "Antibody forming cells in human colostrum after oral immunization" Nature 257:797.
82. Smith, C.W., A.S.Goldman. 1968. Pediatr Res 2:103 en (77).
83. Ho, P.C., J.W.Lawton. 1978. "Human colostrum cells: phagocytosis and killing of E.coli and C.albicans" J Pediatr 93:910.
84. Pittard, W.B. 1979. "Breast Milk Immunology" Am J Dis Child 133:83.

85. Ogra,S.S., P.L.Ogra. 1978. 'Immunologic aspects of human colostrum and milk. II.Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after the onset of lactation' J Pediatr 92:550.
86. Goldman,A.S., C.Smith. 1973. 'Host resistance factors in human milk' J Pediatr 82:1082.
87. Carlsson,B., L.Gothefars, S.Ahlfstedt. 1976. 'Studies of Escherichia coli O antigen specific antibodies in human milk, maternal serum and cord blood' Acta Paediatr Scand 65:216.
88. Jolles,P, J.Jolles. 1961. 'Lysozyme from human milk' Nature 192:1187.
89. Mori,M., A.Hayward. 1982. 'Phenotype and function of human milk monocytes as antigen presenting cells' Clin Immunol Immunopathol 23:94.
90. Cole,F.S., E.Schneeberger, N.Lichtenberg, H.Colten. 1982. 'Complement biosynthesis in human breast-milk macrophages and blood monocytes' Immunol 46:429.
91. Masson,P.L., J.Heremans, C.Kive. 1966. 'An iron binding protein common to many external secretions' Clin Chem Acta 14:735 en (77).
92. Pittard, W.B. 1977. 'The breast milk macrophage' J Reticuloendoth Soc 22:597.
93. Subiza,J.L., C.Rodriguez, A.Figueroa, P.Mateos, R.Alvarez, E.de la Concha. 1988. 'Impaired production and lack of secretion of IL-1 by human breast milk macrophages' Clin Exp Immunol 71:493.
94. Treves,A., V.Barak, I.Tal, Z.Fuks. 1983. 'Constitutive secretion of interleukin 1 by human monocytes' J Immunol 13:647.
95. Koretzky, G.A., J.Elias, S.Kay. 1983. 'Spontaneous production of interleukin 1 by human alveolar macrophages' Clin Immunol Immunopath 29:443.
96. Struhar,D., R.Harbeck. 1990. 'Anti-Ia antibodies inhibit the spontaneous secretion of IL-1 from silicotic rat alveolar macrophages' Immunol Lett 23:31.
97. Wewers,M. S.Rennard, A.Hance, P.Bitterman, R.Crystal. 1984. 'Normal human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage have a limited capacity to release interleukin-1' J Clin Invest 74:2208.
98. Goldman,A.S., L.W.Thorpe, R.M.Goldblum, L.Hanson. 1986. 'Anti-inflammatory properties of human milk' Acta Paediatr Scand 75:689.
99. Chang,E.B., M.W.Musch, L.Mayer. 1990. 'Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine'. Gastroenterology (98):1518.
100. Cavalleri,S., G.Bohach, I.Snyder. 1984. 'Escherichia coli a-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity' Microbiol Rev 48:326 en (101).
101. Bhakdi,S., M.Muhty, S.Korom, G.Schmidt. 1990. 'Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. cytotoxic action and stimulation of interleukin 1 release' J Clin Invest 85:1746.

102. Hopper, K., P. Wood, D. Nelson. 1979. "Macrophage heterogeneity" Vox Sang 36:257 en Lasser, A. 1983. Human Pathology 14:108.
103. Tamatani, T., H. Tsunoda, H. Iwasaki, M. Kaneko, T. Hashimoto, K. Onozaki. 1988. "Existence of both IL-1a and b in normal human amniotic fluid: unique high molecular weight form of IL-1b" Immunol 65:337.
104. Glover, D., D. Brownstein, S. Burchett, A. Larsen, C. Wilson. 1987. "Expression of HLA class II antigens and secretion of interleukin-1 by monocytes and macrophages from adults and neonates" Immunol 61:195.
105. Gotherf, Y., C.A. Dinarello, M. Yamin, N. Sharon, Y. Milner, E. Gazit. 1989. "IL-1 production by T6 (CD1a) positive cord blood mononuclear cells (Langerhan's cell precursors?) Lymphokine research 8:373.
106. Schult, K.E., D. Powell. 1980. "Phagocytic dysfunction in monocytes of normal newborn infants". Pediatrics 85(3):501-504.
107. Wilson, C., W. Weaver. 1985. "Comparative susceptibility of group B streptococci and Staphylococcus aureus to killing by oxygen metabolites" J Infect Dis 152:323 en (107).
108. Kretschmer, R., P. Stewardson, C. Papierniak, S. Gotoff. 1976. "Chemotactic and bactericidal capacities of human newborn monocytes" J Immunol 177:1303.
109. Orłowski, J., B. Anthony, L. Sieger. 1976. "Bactericidal capacity of monocytes of newborn infants" J Pediatr 89:797.
110. Wilson, C. 1986. "Immunological basis for increased susceptibility of the neonate to infection" J Pediatr 108:1.
111. Ogra, S.S., D. Weintraub, P.L. Ogra. 1977. "Immunologic aspects of human colostrum and milk. III. Fate and absorption of cellular and soluble components in the gastrointestinal tract of the newborn" J Immunol 119:245.
112. Mohr, J. 1973. "The possible induction and/or acquisition of cellular hypersensitivity associated with ingestion of colostrum" J Pediatr 82:1062.