

117  
2eJ.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERISTICAS Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS**

**DE LA IL-6 Y SU RECEPTOR**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**TRABAJO MONOGRAFICO DE  
ACTUALIZACION**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**P R E S E N T A :**

**MARIA GUADALUPE REYES GARCIA**



MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

# INDICE

| CAPITULO | CONTENIDO                                      | PAGINA |
|----------|--|--------|
| 1.       | INTRODUCCION.....                              | 1      |
| 2.       | CITOCINAS.....                                 | 3      |
| 2. 1.    | Generalidades.....                             | 3      |
| 2. 2.    | Factores estimulantes de la hematopoyesis..... | 6      |
| 2. 2. 1. | EPO.....                                       | 6      |
| 2. 2. 2. | GM-CSF.....                                    | 6      |
| 2. 2. 3. | CSF-1.....                                     | 9      |
| 2. 2. 4. | G-CSF.....                                     | 9      |
| 2. 2. 5. | IL.....  | 9      |
| 2. 3.    | Factores necrosantes de tumores.....           | 9      |
| 2. 3. 1. | TNF $\alpha$ .....                             | 9      |
| 2. 3. 2. | TNF $\beta$ .....                              | 10     |
| 2. 4.    | Interferones.....                              | 10     |
| 2. 5.    | TGF $\beta$ .....                              | 10     |
| 2. 6.    | Interleucinas.....                             | 11     |
| 3.       | INTERLEUCINAS.....                             | 12     |
| 3. 1.    | Generalidades.....                             | 12     |
| 3. 2.    | IL-1.....                                      | 12     |
| 3. 3.    | IL-2.....                                      | 13     |
| 3. 4.    | IL-3.....                                      | 14     |
| 3. 5.    | IL-4.....                                      | 14     |
| 3. 6.    | IL-5.....                                      | 16     |
| 3. 7.    | IL-6.....                                      | 16     |
| 3. 8.    | IL-7.....                                      | 16     |
| 3. 9.    | IL-8.....                                      | 16     |
| 3. 10.   | IL-9.....                                      | 17     |
| 3. 11.   | IL-10.....                                     | 17     |
| 3. 12.   | IL-11.....                                     | 18     |
| 3. 13.   | IL-12.....                                     | 18     |
| 4.       | IL-6 : PURIFICACION Y CARACTERIZACION.....     | 20     |
| 4. 1.    | Antecedentes históricos.....                   | 20     |
| 4. 2.    | El gene.....                                   | 23     |
| 4. 2. 1. | Estructura.....                                | 23     |
| 4. 2. 2. | Control de la expresión.....                   | 27     |
| 4. 2. 3. | El Promotor del gene.....                      | 27     |
| 4. 2. 4. | Factores nucleares.....                        | 31     |
| 4. 3.    | La proteína.....                               | 32     |
| 4. 3. 1. | Composición de aminoácidos.....                | 32     |
| 4. 3. 2. | Variades de la IL-6.....                       | 36     |
| 4. 3. 3. | Relación estructura-actividad.....             | 38     |
| 4. 3. 4. | Homología con otras proteínas.....             | 39     |
| 4. 4.    | Origen celular.....                            | 41     |

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| 4. 5.       | El Receptor de la IL-6 [IL-6R].....              | 44  |
| 4. 5. 1.    | Aislamiento y localización del gene.....         | 44  |
| 4. 5. 2.    | Caracterización del IL-6R.....                   | 45  |
| 4. 5. 3.    | Varietades del IL-6R.....                        | 49  |
| 4. 5. 4.    | La glucoproteína 130.....                        | 49  |
| 4. 5. 5.    | Células que expresan el IL-6R.....               | 51  |
| 4. 5. 6.    | Control de la expresión del IL-6R.....           | 52  |
| 5.          | REGULACION DE LA PRODUCCION DE IL-6.....         | 54  |
| 5. 1.       | Los inductores.....                              | 54  |
| 5. 2.       | Control de la producción.....                    | 58  |
| 5. 3.       | Los mensajeros intracelulares.....               | 60  |
| 5. 4.       | Mecanismos de transducción.....                  | 61  |
| 6.          | PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLOGICAS.....          | 63  |
| 6. 1.       | Estimula hibridomas y plasmocitomas.....         | 63  |
| 6. 2.       | Estimula la diferenciación de linfocitos B.....  | 66  |
| 6. 3.       | Activa los linfocitos T.....                     | 71  |
| 6. 4.       | Estimula los linfocitos Tc.....                  | 74  |
| 6. 5.       | Estimula la respuesta de fase aguda.....         | 77  |
| 6. 5. 1.    | La respuesta de fase aguda.....                  | 77  |
| 6. 5. 2.    | Participación de IL-6.....                       | 80  |
| 6. 6.       | Estimula la hematopoyesis.....                   | 88  |
| 6. 7.       | Inhibe proliferación de líneas celulares.....    | 90  |
| 7.          | METODOS PARA MEDIR CONCENTRACION.....            | 92  |
| 7. 1.       | La interleucina.....                             | 92  |
| 7. 2.       | Métodos cuantitativos.....                       | 93  |
| 7. 2. 1.    | Bioensayos.....                                  | 93  |
| 7. 2. 1. 1. | Proliferación celular.....                       | 93  |
| 7. 2. 1. 2. | Producción de anticuerpos.....                   | 93  |
| 7. 2. 1. 3. | Producción de proteínas de fase aguda....        | 94  |
| 7. 2. 2.    | ELISA.....                                       | 94  |
| 7. 2. 3.    | Radioinmunoensayo.....                           | 95  |
| 7. 3.       | Métodos cualitativos.....                        | 95  |
| 7. 3. 1.    | Cromatografía de afinidad.....                   | 95  |
| 7. 3. 2.    | Inmunoprecipitación.....                         | 95  |
| 7. 3. 3.    | Inmunoblotting.....                              | 96  |
| 7. 3. 4.    | Inmunohistoquímica.....                          | 96  |
| 8.          | OTRAS ACTIVIDADES BIOLOGICAS.....                | 97  |
| 8. 1.       | Sistema nervioso.....                            | 97  |
| 8. 2.       | Estimulación del sistema endócrino.....          | 101 |
| 8. 2. 1.    | Pituitaria anterior.....                         | 101 |
| 8. 2. 2.    | Mecanismos de inducción.....                     | 104 |
| 8. 3.       | Timo.....  | 107 |
| 8. 4.       | Endometrio.....                                  | 108 |
| 8. 5.       | Placenta.....                                    | 109 |
| 8. 6.       | Otras actividades biológicas poco conocidas..... | 111 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>9. INTERLEUCINA-6 Y ENFERMEDAD.....</b>              | <b>112</b> |
| 9. 1. Desregulación de su expresión.....                | 112        |
| 9. 2. Inducción de mielomas y plasmocitomas.....        | 113        |
| 9. 3. Enfermedad de Castleman.....                      | 114        |
| 9. 4. Linfoma de Lennert.....                           | 115        |
| 9. 5. Enfermedades autoinmunes.....                     | 115        |
| 9. 6. Mixoma cardíaco.....                              | 116        |
| 9. 7. Artritis reumatoide.....                          | 116        |
| 9. 8. Lupus eritematoso sistémico.....                  | 120        |
| 9. 9. Glomerulonefritis proliferativa del mesangio..... | 124        |
| 9. 10. Diabetes mellitus.....                           | 125        |
| 9. 11. Infecciones.....                                 | 127        |
| 9. 11. 1. Infecciones bacterianas.....                  | 127        |
| 9. 11. 2. Infecciones virales.....                      | 130        |
| 9. 11. 3. SIDA.....                                     | 132        |
| 9. 12. Cáncer.....                                      | 138        |
| 9. 13. Enfermedad de Alzheimer.....                     | 146        |
| 9. 14. Enfermedad de Paget.....                         | 148        |
| 9. 15. Enfermedades desgastantes.....                   | 149        |
| <b>10. RESUMEN.....</b>                                 | <b>150</b> |
| <b>11. COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIONES.....</b>      | <b>151</b> |
| <b>13. BIBLIOGRAFIA.....</b>                            | <b>156</b> |
| <b>14. APENDICE.....</b>                                | <b>182</b> |
| 14. 1. Lista de Abreviaturas.....                       | 182        |
| 14. 2. Lista de Figuras.....                            | 185        |
| 14. 3. Lista de Tablas.....                             | 186        |

## 1. Introducción

---

Los adelantos tecnológicos de las últimas décadas han influido decisivamente en el desarrollo de la inmunología. Con la ayuda de un equipo de laboratorio mucho más avanzado que el utilizado en la década de los años 50 por Porter, Edelman y Nisonoff (Premios Nobel, 1959), los inmunólogos de hoy en día han descubierto los mecanismos moleculares que controlan la especificidad de la respuesta del sistema inmunitario y, además, han podido aprovechar la ingeniería genética para sintetizar los principales péptidos inmunomoduladores. Como una consecuencia, ha sido posible definir la participación del sistema inmunitario en la etiopatogenia de diversas enfermedades y han aumentado rápidamente las aplicaciones de la inmunología para mejorar la salud de la población mundial.

La profilaxis de las infecciones se ha ampliado con la producción de vacunas sintéticas. Los nuevos agentes inmunosupresores han mejorado considerablemente el pronóstico de los trasplantes de órganos con los cuales se prolonga la vida de numerosas personas. Varias enfermedades que tenían una etiopatogenia incierta o mal definida, como la diabetes tipo I o la esclerosis múltiple, ahora están caracterizadas como trastornos del sistema inmunitario. La clasificación de otras enfermedades, como las inmunodeficiencias, así como los estudios para su tratamiento representan actualmente un trabajo de identificación de genes o secuenciación de los aminoácidos que componen pequeñas moléculas sobre la membrana de algunas células. De los laboratorios han surgido numerosos productos biológicos inmunológicamente activos, como las hormonas del timo, que han sido utilizados para recuperar las funciones de glándulas dañadas o ausentes. Asimismo, otras moléculas obtenidas en los laboratorios, como los interferones o las interleucinas, han servido para modular algunas funciones inmunológicas que han perdido su control o que necesitan ser reforzadas.

Este último aspecto, el de los mensajeros y los moduladores de la respuesta del sistema inmunológico, ha adquirido una inusitada importancia en el curso de los últimos

años. Algunos han comparado el auge actual de su producción y de sus aplicaciones con el que tuvo, en su inicio, la producción de antibióticos.

El presente trabajo de revisión está dirigido a actualizar el conocimiento adquirido respecto a la estructura química y las principales actividades biológicas de uno de esos moduladores, la interleucina-6 (IL-6), que fue descubierto hace poco tiempo. El significado biológico de esta molécula ha resultado tan amplio y heterogéneo que, para los propósitos de un trabajo de actualización, se ha considerado conveniente ubicarla simultáneamente en dos capítulos, el de los mediadores y el de los moduladores de la inmunidad. Por esta razón, la primera parte del trabajo está dedicada a revisar, brevemente, el conocimiento que se tiene actualmente sobre las citocinas en general y, sobre las interleucinas en particular, para comparar e interrelacionar sus numerosas actividades. Tan solo una vez completo este marco de referencia, el trabajo se dirige concretamente hacia la IL-6, para definir sus principales características y ordenar, así como analizar y discutir, la información acumulada respecto a sus principales actividades biológicas.

## 2. Citocinas

---

### 2.1. Generalidades.

La efectividad de las funciones del sistema inmunitario depende de diferentes subpoblaciones de células inmunocompetentes. Para que una respuesta inmunitaria se inicie, se desarrolle y resulte efectiva, se requiere que todas esas células interactúen entre sí de una manera ordenada. Esto solamente es posible gracias a la existencia de diversas señales que permiten la comunicación intercelular. Cuando las células se comunican mediante la adhesión de sus membranas, las señales se transmiten por la interacción de varias moléculas, denominadas "**integrinas**", que se encuentran en la matriz extracelular <sup>(241)</sup>. En cambio, la comunicación a distancia implica la producción de otras moléculas, mensajeros, que se liberan hacia el espacio intersticial y que se conocen como "**citocinas**".

Las citocinas son proteínas con múltiples actividades biológicas que se producen en una gran variedad de células del cuerpo. Ejercen funciones muy importantes en muchos procesos fisiológicos y son fundamentales para el establecimiento y el desarrollo de las respuestas del sistema inmunitario. Las principales citocinas son las linfocinas, las monocinas, las interleucinas, los interferones y los factores de crecimiento. Todas ellas son mensajeros químicos que comunican entre sí distintos tipos de células. De este modo, amplifican la respuesta inmunitaria, modulan su desarrollo y mantienen la homeostasis del organismo <sup>(55, 68, 212)</sup>.

Las citocinas son fundamentales para conservar la salud. Sin embargo, se ha observado que la patogenia de varias enfermedades inmunológicas se encuentra asociada a un exceso o un defecto en la síntesis de estas moléculas. Asimismo, por la razón anterior, algunas citocinas han sido utilizadas como agentes terapéuticos de varios trastornos inmunológicos <sup>(75)</sup>.



Las citocinas poseen las siguientes características que son comunes a todas ellas :

1. Son proteínas de bajo peso molecular (menos de 80 kDa) y generalmente se encuentran glucosiladas.
2. Participan en el desarrollo de numerosos procesos inmunitarios e inflamatorios, regulando su amplitud y duración.
3. Su producción es local y transitoria, actuando de manera autócrina.
4. Ejercen su acción a concentraciones de picomoles, lo que las hace extremadamente potentes.
5. Interactúan con receptores específicos, los cuales están localizados en la superficie de las células blanco, con una densidad aproximada que varía entre 10 y 10,000 receptores por célula.
6. Su unión a dichos receptores provoca un cambio en el patrón de síntesis de RNA celular y de proteínas, modificando el comportamiento de éstas células.
7. Cada una de ellas posee múltiples actividades, algunas de las cuales están compartidas con otras citocinas.

Los efectos biológicos de las citocinas se pueden presentar en cadena, a través de los siguientes mecanismos :

1. Unas citocinas pueden inducir la producción de otras.
2. Algunas citocinas modulan la expresión de los receptores específicos para otras, en la superficie de sus células blanco.
3. Casi todas las citocinas pueden estimular las funciones celulares de una manera sinérgica, aditiva o antagonica.

La identificación y caracterización de las citocinas, así como el estudio de sus propiedades químicas y biológicas, ha sido posible mediante el uso de cultivos celulares y de las técnicas de aislamiento y clonación de genes. Con estos procedimientos se han producido cantidades considerables de ellas en forma pura, empleando como fuente de estos genes a células humanas y de ratón. Entre las principales células que normalmente las producen se encuentran los fibroblastos, los queratinocitos, las células endoteliales, los linfocitos y los monocitos.

En el organismo, las citocinas son secretadas de manera natural, en respuesta al estímulo de una serie de factores externos e internos. Entre éstos, los principales son los agentes infecciosos, las células tumorales, los complejos antígeno-anticuerpo [Ag-Ac],

las toxinas de los microorganismos y, en general, el daño tisular por distintas causas. Las citocinas estimulan las células y generan respuestas de poca duración, que al principio son inespecíficas y locales. Posteriormente, esas respuestas se pueden amplificar y extenderse hacia otras partes del organismo. Todo esto implica la puesta en marcha de un conjunto de eventos que son necesarios para la limitación, el rechazo y la reparación de las lesiones tisulares causadas por cualquiera de los agentes mencionados. Las citocinas son una parte importante de las respuestas inflamatoria e inmunitaria. En este último caso destacan sus efectos reguladores sobre la proliferación y la activación de las células fagocíticas y los linfocitos T y B.

La síntesis de las citocinas ocurre en una forma conjunta y organizada. Su producción de manera natural no es indiscriminada, sino que está sujeta a diversos controles. Las citocinas se regulan unas a otras mediante varios mecanismos. Los más conocidos son la competencia entre ellas, la interacción e inducción mutua en cascada y los mecanismos de retroalimentación positiva o negativa <sup>(13)</sup>.

**TABLA I. CLASIFICACION DE LAS CITOCINAS MAS IMPORTANTES.**

- I. Factores estimulantes de la hematopoyesis.**
  - 1. ERITROPOYETINA.
  - 2. FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS,
  - 3. FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACROFAGOS,
  - 4. FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS,
  - 5. INTERLEUCINAS.
- II. Factores necrosantes de tumores.**
  - 1. TNF $\alpha$  / CAQUECTINA,
  - 2. TNF $\beta$  / LINFOTOXINA.
- III. Interferones.**
  - 1. IFN $\alpha$ ,
  - 2. IFN $\beta$ ,
  - 3. IFN $\gamma$ .
- IV. Factores de transformación del crecimiento.**
  - 1. TGF $\beta$ 1 o CIF-A,
  - 2. TGF $\beta$ 2 o CIF-B,
  - 3. TGF $\beta$ 1, 2,
  - 4. TGF $\beta$ 3.
- V. Interleucinas.**

## 2. 2. Factores estimulantes de la hematopoyesis.

Son un conjunto muy importante de citocinas que comparten, como característica, la capacidad de estimular la formación de colonias de células hematopoyéticas provenientes de progenitores localizados en la médula ósea. Por esa razón, se les conoce también como "**Factores Estimulantes de Colonias**" (CSF). Los CSF funcionan como reguladores de la proliferación y diferenciación de diversos tipos de células sanguíneas, entre los cuales se pueden mencionar los neutrófilos, monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas, eosinófilos y basófilos. Todas estas células se producen normalmente en la médula ósea aunque, en ciertas condiciones, como durante la vida intrauterina, la hematopoyesis también puede ocurrir en el hígado y en el bazo. Los CSF son importantes desde un punto de vista inmunológico porque, gracias a ellos, se mantiene un flujo constante de linfocitos y monocitos, desde la médula ósea hacia los órganos linfoides primarios y secundarios (8, 39, 315).

### 2. 2. 1. Eritropoyetina [EPO].

Se produce en las células intersticiales del riñón. Aunque se desconoce su agente inductor, se sabe que su producción depende de la presión parcial de O<sub>2</sub> en la sangre. Su principal actividad biológica es la de regular la eritropoyesis, estimulando la maduración de los precursores de los eritrocitos, la síntesis de hemoglobina y la liberación de los reticulocitos a la circulación. Las concentraciones elevadas de EPO también estimulan la producción de megacariocitos (179).

### 2. 2. 2. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos [GM-CSF] se produce normalmente por el estímulo de varias citocinas que son sintetizadas en diferentes células. Así por ejemplo, las interleucinas 1 [IL-1] y 2 [IL-2] estimulan linfocitos T para que produzcan GM-CSF; el mismo factor puede ser sintetizado por las células endoteliales cuando éstas son estimuladas por la IL-1 y el factor necrosante de tumores [TNF]. En experimentos realizados con monos Rhesus inyectados con el GM-CSF, a los animales se les ha provocado un incremento significativo en la cantidad de granulocitos, monocitos y linfocitos circulantes. Este factor también activa la capacidad que tienen las células de la serie granulocítica para fagocitar y lisar células tumorales (183).

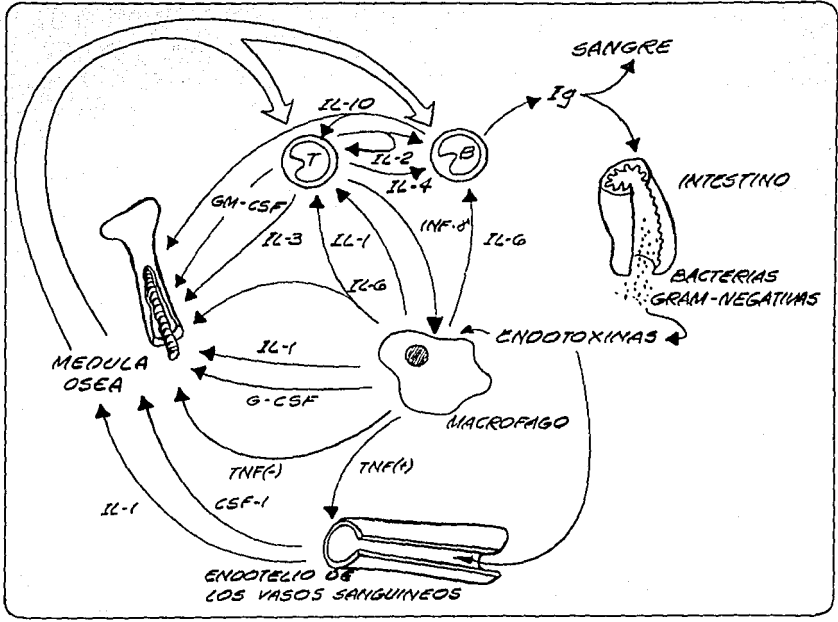


Figura 1. Esquema que muestra la estimulación simultánea del tejido hematopoyético por diferentes citocinas. Los factores estimulantes de la médula ósea pueden ser producidos por varias células, particularmente por los macrófagos, después de su interacción con varios factores inductores. Entre éstos últimos destacan los residuos lipopolisacáridos que proceden de la pared celular de las bacterias Gram negativas, las cuales se encuentran localizadas en el intestino. La estimulación continúa del tejido hematopoyético asegura un flujo adecuado de linfocitos T y B, inmaduros, desde la médula ósea hasta los órganos linfoides primarios y secundarios.

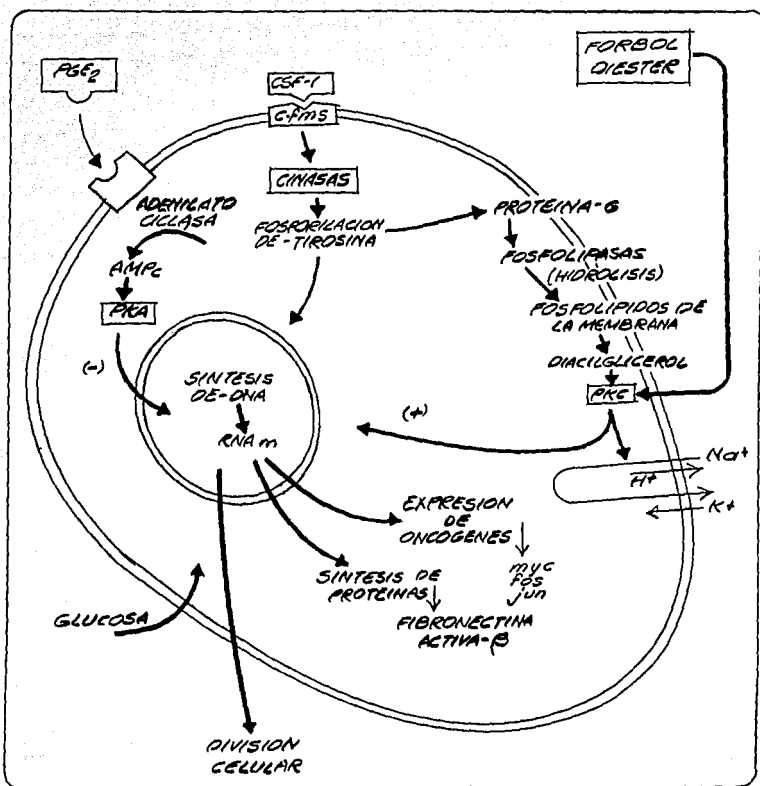


Figura 2. Esquema sobre los mecanismos propuestos para explicar la inducción de la síntesis de DNA por el CSF-1. Este factor estimula la proliferación, diferenciación y activación de las células precursoras de los macrófagos que se encuentran en el tejido hematopoyético de la médula ósea. La unión del CSF-1 al producto del proto-oncogene *c-fms* se continúa con la internalización del complejo ligando-receptor y con la activación de las cinasas que fosforilan la tirosina de diversos sustratos e inician una respuesta celular en cascada. Para que este último evento se lleve a cabo ocurre una hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, aumenta la síntesis de DNA y la formación de RNAm, aumenta la expresión de varios oncogenes y se inicia la síntesis de varias proteínas estructurales, enzimáticas o de secreción. La unión de IL-6 con su receptor induce una respuesta similar de las células hematopoyéticas.

### 2. 2. 3. Factor estimulante de colonias de macrófagos [CSF-1].

Estas glucoproteínas pueden ser producidas en macrófagos estimulados por el interferón [IFN] y el TNF, en células endoteliales estimuladas por IL-1 y TNF y, además, en fibroblastos estimulados por IL-1. A su vez, los CSF-1 estimulan las células progenitoras de los monocitos para que se diferencien hacia colonias de monocitos (179).

### 2. 2. 4. Factor estimulante de colonias de granulocitos [G-CSF].

Este factor puede ser producido por varias células. En las células endoteliales, su síntesis se induce con IL-1 y TNF; en los fibroblastos, por el TNF y, en los monocitos, por el IFN y el TNF. Los efectos del G-CSF son la estimulación de la proliferación de las células progenitoras de los granulocitos y, en asociación con IL-3 e IL-6, de las células madres hematopoyéticas. Su administración incrementa considerablemente y de manera exclusiva el número de granulocitos periféricos (71, 179).

### 2. 2. 5. Interleucinas.

Existen varias interleucinas con la propiedad de estimular las células de la médula ósea. La interleucina-3 (IL-3) es una de las más conocidas, pero también se ha demostrado que IL-1, IL-6, IL-7 e IL-10 tienen un efecto similar. Las actividades biológicas de todas ellas serán analizadas en el capítulo siguiente.

## 2. 3. Factores Necrosantes de Tumores [TNF].

Estas citocinas pueden ser sintetizadas en los monocitos y los macrófagos que son estimulados por polisacáridos o lipopolisacáridos [LPS] de bacterias, hongos y protozoarios. Hasta ahora se conocen dos TNF diferentes que han sido denominados  $\alpha$  y  $\beta$ .

### 2. 3. 1. TNF $\alpha$ o caquectina.

Es una glucoproteína multifuncional que comparte muchas actividades biológicas con la IL-1. Tiene una acción directa antiviral y antitumoral. Produce fiebre por estimulación del hipotálamo y altera el metabolismo de las grasas, ocasionando una

pérdida de peso que puede llegar hasta la caquexia, razón por la cual también se le conoce como "caquectina". El  $TNF\alpha$  estimula las actividades de los linfocitos T y deprime la producción de anticuerpos por los linfocitos B (4, 29, 215).

### 2. 3. 2. $TNF\beta$ o linfotóxina (LT).

Es una glucoproteína que, en los ratones, se produce en los linfocitos T CD4 de la clase II ( $TH_2$ ), los cuales también sintetizan IL-2 e  $IFN\gamma$  cuando son estimulados por antígenos específicos o por mitógenos de células T. Las clonas de linfocitos T citotóxicos [Tc] producen LT cuando reaccionan con sus antígenos específicos o cuando son estimuladas por la Concanavalina A [Con-A]. Los leucocitos de sangre periférica también pueden producir LT cuando son estimulados con mitógenos o con éster forbol más mitógenos. Otros inductores de su producción son el virus de la estomatitis vesicular, el virus del herpes simple o la adición al medio de cultivo de poli-C. La LT es un factor citotóxico que, además, aumenta la vascularidad capilar y causa inflamación. Participa en la defensa del huésped contra tumores y lo defiende contra los microorganismos invasores, como los parásitos por ejemplo. Sus principales actividades inmunológicas son incrementar la expresión de antígenos de histocompatibilidad Clase II y mediar la actividad lítica de las células Tc (5, 219).

### 2. 4. Interferones [IFN].

Los IFN son proteínas solubles, cuya existencia se conoce desde 1957. Existen tres clases de interferones humanos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) que son antigénicamente distintos y que se producen en diferentes poblaciones celulares, cuando éstas son estimuladas con diferentes agentes inductores. En líneas generales, los IFN son proteínas que modifican la multiplicación y la diferenciación de una gran variedad de células y que, además, tienen una potente acción antiviral, inmunomoduladora y anti-proliferativa. Incrementan las funciones bactericidas y tumoricidas de los macrófagos. También aumentan la síntesis de IL-1 y la expresión tanto de los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas como de los antígenos de histocompatibilidad, clases I y II. Los IFN tienen, además, un efecto directo sobre las actividades parecidas a las de las células asesinas naturales [NK] en los linfocitos granulares grandes [LGL] y sobre la diferenciación de los linfocitos T y B (68, 281).

en los linfocitos granulares grandes [LGL] y sobre la diferenciación de los linfocitos T y B (68, 281).

## **2. 5. Factor $\beta$ de Transformación del Crecimiento [TGF- $\beta$ ].**

Es un factor de crecimiento para fibroblastos que promueve la cicatrización de las heridas. Estimula la resorción osteoclástica del hueso y activa los osteoblastos. Inhibe la generación de linfocitos T citotóxicos y la proliferación de linfocitos T y B. Suprime el desarrollo de células NK y de linfocitos asesinos activados por linfocinas [LAK]. Bloquea los efectos estimulantes de la proliferación que tiene la IL-2 sobre los linfocitos T y B. Inhibe la producción policlonal de anticuerpos. TGF $\beta$  posee una actividad antiproliferativa y se le puede considerar como un inhibidor de la hematopoyesis y de la inmunidad. Es producido por una gran variedad de tipos celulares como las plaquetas, los linfocitos y los macrófagos activados, así como por las células de la placenta, de los riñones y de los huesos. Hasta ahora se conocen los cuatro siguientes factores de transformación del crecimiento : TGF $\beta_1$  o CIF-A, TGF $\beta_2$  o CIF-B, TGF $\beta_{1,2}$  y TGF $\beta_3$  (281)

## **2. 6. Interleucinas.**

Este conjunto de citocinas se describe en el capítulo siguiente.



### 3. Interleucinas (IL)

---

#### 3. 1. GENERALIDADES.

Se denomina "interleucinas" a un conjunto de proteínas que funcionan como mensajeros porque, directa o indirectamente, permiten la comunicación entre diferentes subpoblaciones de leucocitos que participan en la respuesta del sistema inmunitario.

Las interleucinas representan el grupo más amplio y diverso de las citocinas. Hasta ahora han sido identificadas 12 clases diferentes. De todas ellas, solamente las diez primeras han sido aceptadas por el grupo de expertos que forman parte del Subcomité para la nomenclatura de las interleucinas, el cual está auspiciado por la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) <sup>(337)</sup>. Esto se debe a que son varios los criterios exigidos para la denominación oficial de una molécula como interleucina. Así por ejemplo, una interleucina debe haber sido purificada, clonada molecularmente y expresada por un grupo de células cultivadas. Los nucleótidos de su DNAc y los aminoácidos que la componen deben tener secuencias distintas a las que ya han sido descritas para otras moléculas conocidas. Además, debe tratarse de un producto natural, sintetizado por células del sistema inmunitario, que sea el mediador de una función potencialmente importante para la respuesta del sistema y, preferiblemente, debe desarrollar más de una actividad biológica <sup>(212)</sup>. A continuación se describen brevemente las principales características y actividades biológicas de las doce interleucinas que han sido caracterizadas hasta ahora.

#### 3. 2. INTERLEUCINA 1 [IL-1].

Se conoce desde 1972, cuando se la identificó como un factor, producido por los macrófagos, que podía actuar como estimulante de la proliferación de linfocitos murinos. Esta proteína se presenta en forma de dos péptidos distintos: IL-1 $\alpha$  o factor activante de linfocitos [LAF] e IL-1 $\beta$  o factor activante de células B [BAF], que tienen propiedades

bioquímicas similares pero que son distintos desde un punto de vista antigénico. Las IL-1,  $\alpha$  y  $\beta$ , son producidas principalmente por los macrófagos y, además, por los queratinocitos, las células endoteliales, los fibroblastos, los linfocitos T y B, las células dendríticas, los neutrófilos, las células del músculo liso y, en general, por casi todas las células nucleadas de los organismos vertebrados. Su producción es estimulada por adyuvantes como el muramil dipéptido [MDP] y los LPS. Otros inductores son las sustancias activadoras de los linfocitos como el TNF, los CSF y el IFN $\gamma$ .

Entre las principales actividades biológicas de la IL-1 están la de ser mediador de los fenómenos inflamatorios junto con la IL-6, el TNF $\alpha$ , la IL-8 y las prostaglandinas [PGs]. Posee una actividad antiviral indirecta y puede actuar como agente citostático y citocida sobre células tumorales o infectadas por virus. Tiene la propiedad de estimular las células de la glándula hipófisis y del hipotálamo, a través de las cuales aumenta la síntesis de corticosteroides y produce fiebre. IL-1 también estimula las células progenitoras del tejido hematopoyético, actúa sobre los linfocitos T incrementando su producción de citocinas y promueve la proliferación y la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Puede actuar sobre otros tipos de células, como los fibroblastos, los neutrófilos y las células epiteliales, entre muchas otras, ya sea activándolas, intensificando sus actividades o induciendo la producción de otras citocinas (54, 281).

### 3. 3. INTERLEUCINA 2 [IL-2].

Es un péptido conocido desde 1976 como factor de crecimiento de células T [TCGF]. Estimula la proliferación y la producción de linfocinas por los linfocitos T, pero también actúa sobre los linfocitos B y las células asesinas naturales [NK]. Estimula la formación de células asesinas activadas por linfocina [LAK]. Los macrófagos activados también responden a la IL-2 activando su actividad tumoricida.

Las principales células productoras de IL-2 son los linfocitos TH $_1$  CD4 $^{(+)}$  y también los linfocitos granulares grandes [LGL] CD2 $^{(+)}$  y CD6 $^{(+)}$ . Su producción es inducida por la IL-1, por el reconocimiento de antígenos, por los activadores policlonales de las células TH $_1$  y por la unión de ligandos a los receptores de superficie CD2. Los superantígenos (exotoxinas de estafilococos) que se ligan a las cadenas  $\beta$  del receptor de los linfocitos T, también estimulan la síntesis de grandes cantidades de IL-2, las cuales son las responsables de las manifestaciones clínicas del shock tóxico. Las principales

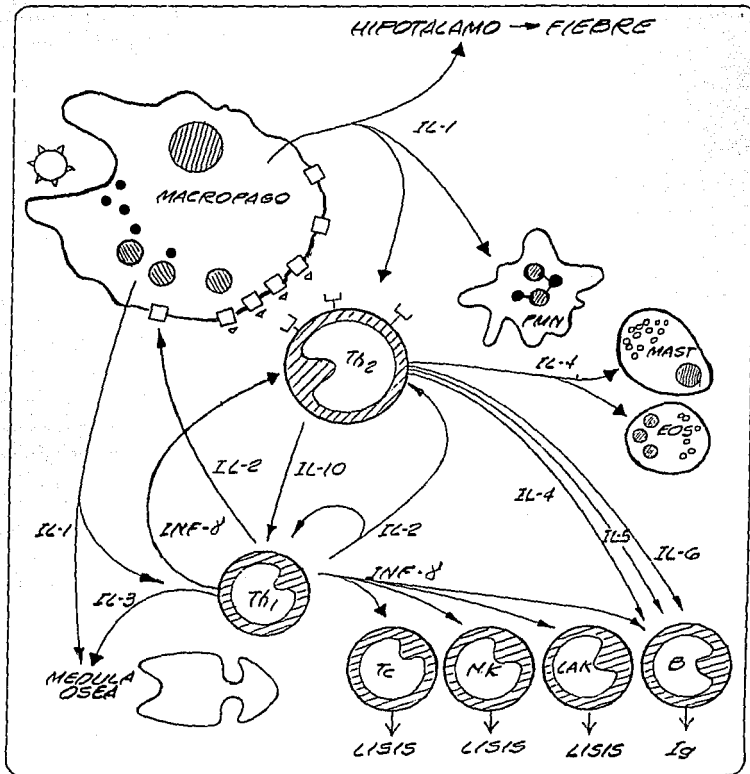
actividades biológicas de IL-2 son estimular los linfocitos T y promover la producción de otras linfoquinas como el IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ , IL-4, IL-6 y, algunos factores estimulantes de la proliferación del tejido hematopoyético como IL-3, IL-5, GM-CSF y TGF $\beta$ . La IL-2 incrementa la citotoxicidad de los linfocitos T y expande la cantidad de células con capacidad de reaccionar con el antígeno. IL-2 ha sido utilizada en el tratamiento de pacientes con ciertos tipos de cáncer, bien sea administrada directamente o incubada con linfocitos autólogos que posteriormente son reinyectados a los enfermos (269, 281).

### 3. 4. INTERLEUCINA 3 [IL-3].

Es un factor estimulante de crecimiento del tejido hematopoyético, producido únicamente por los linfocitos T e inducido por la IL-2. Sus actividades biológicas se extienden a todas las líneas de diferenciación hematopoyéticas, excepto las linfoideas, de modo que estimula y mantiene el crecimiento de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos (179, 281).

### 3. 5. INTERLEUCINA 4 [IL-4].

Es una proteína producida por los linfocitos TH<sub>2</sub>, que estimula principalmente la proliferación de los linfocitos B previamente activados y, por consiguiente, promueve la producción de anticuerpos. Inicialmente fue denominada Factor I de crecimiento de células B [BCGF-I] o Factor I estimulante de células B [BSF-I]. Por lo tanto, es el principal regulador de la expresión de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas [Igs]. Sin embargo, también puede estimular los linfocitos T, las células cebadas y los eosinófilos. Además, coestimula el desarrollo de los precursores hematopoyéticos, junto con los CSF, e induce la maduración de células mieloides. Asimismo, incrementa la expresión superficial de las moléculas Clase II codificadas en el Complejo Principal de Histocompatibilidad [MHC] y de los receptores para la fracción cristalizable [Fc] de la inmunoglobulina E [IgE]. Esta interleucina sinergiza su acción con la IL-2 y es un potente activador de la actividad citocida de los macrófagos, (281).



**Figura 3.** Esquema que muestra las diferentes actividades de las cuatro primeras interleucinas. Los macrófagos y los linfocitos T aparecen como las principales células que las sintetizan. También se muestran las principales células blanco y algunas de las actividades que éstas desarrollan después de recibir el mensaje de las interleucinas.

### 3. 6. INTERLEUCINA 5 [IL-5].

Es producida por los linfocitos TH<sub>2</sub> y, junto con la IL-2, actúa sobre los linfocitos B, estimulando su proliferación y diferenciación. Por esta razón y porque promueve la síntesis de anticuerpos (especialmente los del isotipo IgA producidos por las células plasmáticas que derivan de los linfocitos B), inicialmente se le denominó Factor II del Crecimiento de las Células B [BCGF-II]. La IL-5 también estimula la hematopoyesis, induciendo la diferenciación de las células precursoras de los eosinófilos <sup>(281)</sup>.

### 3. 7. INTERLEUCINA 6 [IL-6].

La IL-6 es una fosfoglucoproteína producida principalmente por los linfocitos TH<sub>2</sub> y por los macrófagos. Participa en la conservación de la continuidad y en el control de la respuesta inmune, así como en la inducción de las reacciones inflamatorias. Primordialmente estimula la diferenciación de los linfocitos B, activa la síntesis de proteínas de fase aguda y estimula la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea, aunque también actúa sobre los sistema nervioso y endócrino. En los capítulos siguientes se describirán sus principales características fisicoquímicas y las actividades biológicas que pueden ser estimuladas después que la IL-6 interacciona con su correspondiente receptor <sup>(330)</sup>.

### 3. 8. INTERLEUCINA 7 [IL-7].

Esta citocina es producida por las células del estroma de la médula ósea y actúa, principalmente, sobre los progenitores de los linfocitos T y B. Por esta razón ha sido considerada como una linfopoyetina. Sin embargo, IL-7 también ejerce su efecto sobre las células precursoras de la serie mieloide y de los megacariocitos <sup>(281)</sup>.

### 3. 9. INTERLEUCINA 8 [IL-8].

Fue conocida inicialmente con los nombres de péptido-1 activador de los neutrófilos [NAP-1], factor monocítico quimiotáctico para neutrófilos [MDNCF] y, además, péptido

monocítico activador de neutrófilos [MONAP]. Es un potente agente quimiotáctico que se une a la heparina. Participa en diversos procesos inflamatorios, atrayendo principalmente a los neutrófilos y a los linfocitos T, hacia los sitios del cuerpo donde se presentan infecciones, traumas, cáncer o isquemias. Sus principales células blanco son los neutrófilos, los cuales tienen aproximadamente 20,000 receptores/célula para IL-8. Los linfocitos T son sensibles a dosis más bajas de la misma interleucina. La IL-8 induce cambios en la morfología de los neutrófilos y los estimula para que se adhieran a las proteínas de la matriz extracelular, al endotelio de las venas umbilicales y a la superficie de los plásticos. Además, induce la transmigración de ellos a través de monocapas de células endoteliales y estimula la expresión de moléculas de adhesión superficiales como ELAM-1. Los resultados de trabajos recientes sugieren que la producción local de IL-8, por las células endoteliales activadas, puede modular las interacciones entre los leucocitos y el endotelio durante la inflamación aguda. Otras células que la producen son los macrófagos, monocitos y fibroblastos (12, 83, 302).

### 3.10. INTERLEUCINA 9 [IL-9].

Es una proteína que se obtuvo del sobrenadante de algunas líneas celulares de linfocitos TH murinos, estimulados con el mitógeno Con-A. Inicialmente se le denominó factor P-40 estimulante del crecimiento de células T murinas. Es muy parecida a un factor de crecimiento hematopoyético humano que estimula la multiplicación de líneas de células leucémicas derivadas de megacarioblastos humanos. Por ello se dice que IL-9 puede actuar sobre células de linaje linfóide y mieloide. Las células que han presentado receptores para IL-9 son los linfocitos TH, los macrófagos y una línea de células cebadas. *In vitro*, sus actividades biológicas son específicas y exclusivas para células TH CD4 (+) productoras de IL-2 ó de IL-4 (314, 344).

### 3.11. INTERLEUCINA 10 [IL-10].

Inicialmente fue denominada factor inhibidor de la síntesis de citocinas [CSIF]. En los linfocitos TH de ratón, la IL-10 es capaz de inhibir la producción de IFN $\gamma$  y de otras citocinas. La IL-10 producida por una línea de linfocitos B posee actividad de factor estimulador del crecimiento de células T, por lo que también se le conoce como factor, derivado de linfocitos B, que estimula el crecimiento de las células T [B-TCGF]. Otras

células productoras de este factor son los timocitos, los esplenocitos estimulados con ionóforos de calcio o con forfol miristato acetato (PMA) y las células CH 12LX.4866 derivadas de un linfoma de linfocitos B. En presencia de IL-2 e IL-4, la IL-10 es capaz de incrementar la proliferación de timocitos fetales e inmaduros, del tipo CD4<sup>(+)</sup> CD8<sup>(-)</sup> CD4<sup>(-)</sup>/8<sup>(+)</sup> y CD4<sup>(-)</sup>/8<sup>(-)</sup>. El efecto es temprano, directo y dependiente de la dosis de IL-10 añadida, la cual también induce la expresión del conjunto de moléculas que forman el antígeno de diferenciación conocido como CD3. La IL-10 es un cofactor para los linfocitos T citotóxicos, ya que, en presencia de IL-2, ellos incrementan significativamente su proliferación (46,168, 190).

### 3. 12. INTERLEUCINA 11 [IL-11].

Es una nueva citocina, descubierta en 1990, que tiene la característica de ser un factor inductor de la megacariopoyesis. Hasta ahora sólo se conoce que es producida por líneas celulares del estroma de la médula ósea y que parece actuar de manera sinérgica con la IL-3, estimulando la formación de colonias de megacariocitos. También se ha comprobado que estimula la proliferación de algunas líneas celulares dependientes de IL-6; además estimula la expresión de los mismos genes de las proteínas de fase aguda que induce esta última interleucina (18).

### 3.13. INTERLEUCINA 12 [IL-12].

Fue descubierta en 1990, como un factor, producido por células B humanas, que era capaz de potenciar la actividad de IL-2 para incrementar la maduración de los linfocitos T citotóxicos [Tc]. Denominado originalmente CLMF, ahora se le conoce como IL-12. Su estructura ha sido considerada muy parecida o idéntica a la de otro factor, que había sido descubierto en 1989, llamado factor estimulador de las células NK [NKSF]. La IL-12 tiene un espectro de actividad diferente al de otros factores estimulantes de los linfocitos T citotóxicos como IL-2, IL-4 e IL-7, ya que actúa sobre células T que se encuentran activadas. En cambio, no provoca la proliferación de estas mismas células cuando ellas se encuentran en reposo (49, 77).

**TABLA II. PRINCIPALES ACTIVIDADES DE LAS INTERLEUCINAS \***

| actividad                          | interleucinas |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|                                    | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Estimulación de la mitosis         | +             | + | + | + | + | + | + |   | + |    |    |    |
| Inhibición de la mitosis tumoral   | +             |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Activación de macrófagos           | +             | + |   | + |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Estimulación de granulocitos       | +             |   | + |   |   |   |   | + |   |    |    |    |
| Estimulación de eosinófilos        |               |   | + | + | + |   |   |   |   |    |    |    |
| Estimulación de linfocitos NK      |               | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    | +  |
| Estimulación de células LAK        |               | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Activación de linfocitos B         |               |   |   | + | + |   |   |   |   |    |    |    |
| Proliferación de linfocitos B      | +             | + |   | + | + |   | + |   |   |    |    |    |
| Diferenciación de linfocitos B     | +             | + |   | + | + | + |   |   |   |    |    |    |
| Activación de linfocitos T         | +             | + |   | + |   | + |   |   |   |    |    |    |
| Proliferación de linfocitos T      | +             | + |   | + |   | + | + |   | + | +  |    |    |
| Diferenciación de linfocitos T     |               | + |   |   |   | + |   |   |   |    |    |    |
| Activación de células endoteliales | +             |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Inducción de fiebre                | +             |   |   |   |   | + |   |   |   |    |    |    |
| Síntesis proteínas fase aguda      | +             |   |   |   |   | + |   |   |   |    | +  |    |
| Actividad antitumoral              | +             | + |   |   |   | + |   |   |   |    |    |    |
| Estimulación hematopoyesis         | +             |   | + | + |   | + | + |   |   |    |    |    |
| Estimulación linfocitos Tc         |               | + |   |   |   | + |   |   |   | +  |    | +  |
| Estimulación megacariocitos        |               |   | + |   |   | + | + |   |   |    | +  |    |

\* Tomada de diversos autores



## 4. IL-6 : Purificación y caracterización

---

### 4. 1. Antecedentes históricos.

Al principio de la década de los años 80 ya se conocía que, por lo menos, dos clases de factores solubles eran necesarios para controlar la diferenciación y la respuesta de anticuerpos de los linfocitos B. Unos de ellos estimulaban la multiplicación de las células activadas y los otros promovían la diferenciación de las mismas para que se convirtieran en células plasmáticas y fueran capaces de liberar los anticuerpos. Estudios realizados posteriormente permitieron separar y purificar algunos de esos factores solubles, los cuales fueron identificados como IL-4, IL-5 e IL-6. Más adelante se pudo determinar la secuencia de sus aminoácidos y clonar sus respectivos ácidos desoxirribonucleicos complementarios [DNAC].

La primera de esas tres interleucinas fue conocida inicialmente como Factor I Estimulante del Crecimiento de los Linfocitos B [BCGF-1 ó BSF-I], una vez que se hubo demostrado que era necesaria para la activación temprana de las células B que se encontraban en reposo. La IL-5, que inicialmente fue llamada Factor II de Crecimiento de las células B [BCGF-II] porque tenía el mismo efecto estimulante que el anterior, también se requiere para el crecimiento de los linfocitos B activados. En cambio, la IL-6 [BCDF o BSF-2] sólo actúa en la diferenciación final de las células B, para que éstas se puedan convertir en células plasmáticas productoras de anticuerpos <sup>(132)</sup>.

La IL-6 es una proteína cuyas principales actividades biológicas fueron conocidas varios años antes de caracterizarla. Inicialmente fue aislada en el sobrenadante de ciertos cultivos celulares e identificada con diversos nombres, los cuales estaban relacionados con los diferentes efectos que ejerce sobre sus células blanco. Su presencia se demostró por primera vez en cultivos de células mononucleares, obtenidas de la sangre periférica, que habían sido estimuladas con mitógenos o con antígenos <sup>(198)</sup>.

La identificación de todas esas moléculas como IL-6 se logró a finales de 1986 y al principio de 1987, mediante el trabajo simultáneo de varios grupos de investigadores. El primer DNAc de la IL-6 lo obtuvieron Weissenbach *et al* <sup>(338)</sup> en 1980, al clonar dos DNAc del IFN $\beta$ , obtenidos a partir de un RNAm de 1.3 kb que había sido inducido por la estimulación de fibroblastos con poli-rI, poli-rC y cicloheximida. El producto de estos DNAc fue una proteína de 26 kDa, que poseía una actividad antiviral, por lo que se le llamó IFN $\beta$ 2 <sup>(338)</sup>. Solo varios años más adelante, se pudo comprobar que el IFN $\beta$ 2 tenía una relación antigénica y funcional con moléculas recombinantes de IL-6 [rIL-6].

Dos años más tarde, en 1982, Content *et al* <sup>(40)</sup> también clonaron este mismo RNAm de 1.3 kb y obtuvieron una proteína [Factor-26K] del mismo peso molecular que el IFN $\beta$ , pero sin una actividad antiviral ni una relación serológica con esta última molécula. Posteriormente, al secuenciar los nucleótidos que codificaban para el Factor-26K, los mismos autores <sup>(40)</sup> encontraron que el DNAc de esta proteína era diferente al del IFN $\beta$ . Así, en una forma paralela, se obtuvo la clonación molecular y la secuenciación de los nucleótidos correspondientes a dos moléculas aparentemente diferentes, las cuales fueron llamadas IFN $\beta$ 2 y proteína 26K, respectivamente <sup>(40, 338)</sup>.

En esos mismos años, otros grupos de investigadores <sup>(168, 300)</sup> descubrieron que las células T producían un factor que estimulaba tardíamente la diferenciación de células B. Además, dicho factor era capaz de inducir la síntesis de inmunoglobulinas, tanto en linfocitos B activados como en líneas de células B infectadas con el virus de Epstein-Barr o en células B normales que habían sido estimuladas con *Staphylococcus aureus*, cepa Cowan I [SAC] <sup>(198)</sup>.

Esta otra proteína, denominada Factor 2 Estimulante de Células B [BSF-2], fue purificada y caracterizada por Hirano *et al* en 1985 <sup>(98)</sup>. Su DNAc también fue obtenido por este mismo grupo de investigadores <sup>(97)</sup>, al año siguiente, a partir de una línea de células T humanas que habían sido transformadas con el virus de la leucemia tipo 1 [HTLV-1]. Posteriormente, al conocerse la secuencia de aminoácidos de la BSF-2, resultó ser idéntica a la de las moléculas IFN $\beta$ 2 y proteína-26K, cuyos nucleótidos habían sido secuenciados previamente <sup>(40, 338)</sup> y presentados como los DNAc correspondientes a dos proteínas diferentes.

El estudio de factores estimulantes del crecimiento de plasmocitomas e hibridomas derivados de linfocitos B humanos y murinos fue otro camino que condujo a la identificación de la IL-6. En 1986, Van Snick *et al* <sup>(326)</sup> purificaron un Factor estimulante del crecimiento de hibridomas, llamado IL-HP1, a partir del sobrenadante de una línea de células TH de ratón. Los estudios iniciales revelaron que esta molécula no parecía tener una secuencia de aminoácidos homóloga con alguna otra proteína conocida. Un año más tarde, Nordan y su equipo de investigadores <sup>(210)</sup> obtuvieron, del sobrenadante de cultivos de macrófagos, otra molécula semejante a la IL-HP1 que fue conocida como Factor estimulante del crecimiento de plasmocitomas [PCT-GF] .

En ese mismo año, Van Damme *et al* <sup>(316)</sup> purificaron otro factor estimulante del crecimiento de hibridomas y plasmocitomas [HPGF], derivado del medio de cultivo de una línea celular de osteosarcoma humano, que había sido tratada previamente con IL-1. La secuencia de aminoácidos en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de dicho factor resultó ser completamente igual al de las moléculas IFNβ<sub>2</sub>, 26K y BSF-2; en cambio, tenía poca homología con el factor conocido como IL-HP1 <sup>(317, 318)</sup>. Poco tiempo después, al clonarse el DNAc de éste último, se demostró que sí poseía homología con el factor estimulante del crecimiento de hibridomas derivados de células humanas o HPGF <sup>(329)</sup> .

Finalmente, en 1987, Poupart *et al* <sup>(227)</sup> propusieron que todas estas moléculas, entre las cuales existían diversos grados de similitudes estructurales y funcionales, fueran denominadas con el nombre genérico de IL-6. En la Tabla siguiente se presenta una lista de todas ellas. Estudios posteriores han aclarado que todas son iguales a la IL-6 <sup>(132)</sup> .

**TABLA III. FACTORES IGUALES A IL-6**

- 
1. INTERFERON β<sub>2</sub>,
  2. PROTEINA de 26 Kd,
  3. FACTOR 2 ESTIMULANTE DE CELULAS B,
  4. FACTOR ESTIMULANTE DE HEPATOCITOS,
  5. FACTOR DE CRECIMIENTO DE MIELOMA/PLASMOCITOMA,
  6. FACTOR 2 INDUCTOR DE GRANULOCITOS/MACROFAGOS,
  7. FACTOR DE DIFERENCIACION DE CELULAS T CITOTOXICAS.
-

## 4. 2. El gene.

La IL-6 se encuentra codificada por un solo gene, tanto en el humano como en el ratón. Los estudios realizados en ambas especies han revelado que entre las secuencias de nucleótidos del gene de la IL-6 y, también, entre las secuencias de aminoácidos de la molécula humana y la murina, existe una homología que alcanza el 60% y el 42%, respectivamente <sup>(396)</sup>. La región 3' no traducible del gene de la IL-6 humana y los primeros 400 pares de bases de su región flanqueante 5', comparten una similitud del 90 % con las mismas regiones del gene de la IL-6 murina. En la segunda de esas dos regiones es donde se ubican las secuencias de nucleótidos del promotor, las cuales pueden ser estimuladas por distintas sustancias, para aumentar la expresión de este gene <sup>(346, 352)</sup>.

### 4. 2. 1. Estructura.

Utilizando el DNAc de la IL-6 de ratón como sonda, Tanabe *et al* <sup>(296)</sup>, en 1988, lograron identificar el gene de la IL-6 de ratón, en una librería genómica del hígado murino, como un segmento de DNA compuesto por aproximadamente 7 kb.

Previamente, Hirano *et al* <sup>(97)</sup>, en 1986, ya habían observado que la formación del RNAm del BSF-2 podía ser inducible. Por un análisis de Northern blot, demostraron la hibridación de la sonda molecular pBSF2.38 (que contiene las secuencias de nucleótidos que codifican el BSF-2) con un RNAm de aproximadamente 1,300 nucleótidos, que había sido obtenido de linfocitos T activados con mitógenos y de células CTL-Na1 (una línea de linfocitos T productores de IL-6 en una forma constitutiva), pero no con el RNAm de linfocitos T control que no habían sido estimulados.

Tanto en el humano como en el ratón, el gene que codifica para la IL-6 está compuesto por 4 intrones y 5 exones. En las personas, este gene se localiza en el brazo corto del cromosoma 7, porción p21 <sup>(61, 255)</sup>. En el caso de los ratones, el gene de la IL-6 se encuentra en el cromosoma 5 y en las ratas, en el cromosoma 4 <sup>(26, 189, 287)</sup>.

En la siguiente figura se representan la secuencia de nucleótidos que codifica para la molécula de la IL-6 humana y la de los aminoácidos correspondientes, según Yasukawa *et al* <sup>(346)</sup>.

ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT CCA GTT GCC TTC TCC

1

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser

CTG GGG CTG CTC CTG GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCT GCC CCA GTA

16

Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val

CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA GAT GTA GCC GCC CCA CAC AGA CAG

31

Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gly

CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC

46

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile

CTC GAC GGC ATC TCA GCC CTG AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT

61

Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser

↑

AAC ATG TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG

76

Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu

AAC CTT CCA AAG ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC CAA TCT GGA

91

Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly

TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT GGT CTT TTG

106

Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu

↑

GAG AGT GAG TTT GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT

121

Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Glu Asn Arg Phe Glu Ser

AGT GAG GAA CAA GCC AGA GCT GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG

136

Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu

```

ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC
151
Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr
      ↑

ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACG AAG CTG CAG
166
Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln

GCA CAG AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG
181
Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu

CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG
196
Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg

CAA ATG TAG
211
Gln Met fin
      ↑

```

**Figura 4.** Secuencia de nucleótidos y de los correspondientes aminoácidos en los 4 exones de la IL-6 humana. Los números corresponden a los aminoácidos y las flechas verticales señalan el final de cada exón.

Los estudios realizados hasta ahora han mostrado que, en el humano y en el ratón, el tamaño de cada uno de los cinco exones es casi igual y que sus respectivos nucleótidos comparten una homología de 74%, 59%, 69%, 65% y 63%. Los intrones también comparten una homología significativa, que va del 63 al 60%, aunque en el caso murino, el tercer intrón posee aproximadamente unos 2,000 pares de bases de más <sup>(296)</sup>.

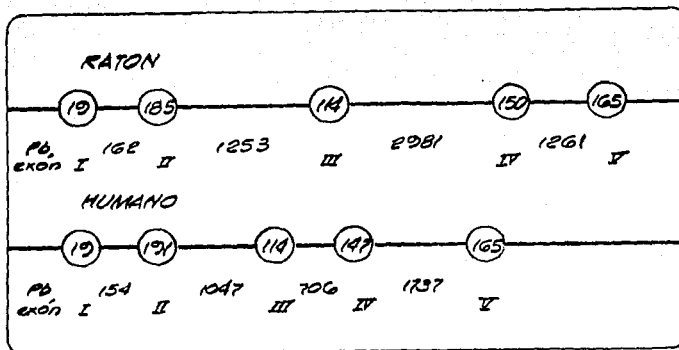


Figura 5. Comparación entre el tamaño (número de nucleótidos) y la localización de los exones y de los intrones en el gene de la IL-6 del ratón y el humano, según Tanabe *et al* (296). El número de nucleótidos para cada uno de los 5 exones ( números romanos) aparece encerrado en un círculo, mientras que el número de nucleótidos de los intrones aparece libre, debajo de la línea horizontal. Se puede observar que el tamaño de los exones es muy similar en ambos genes, a diferencia del número de nucleótidos que componen los intrones.

Por otro lado, la región 3', no traducible, del gene de la IL-6, que es muy similar en ambas especies (humana y murina), ya que presenta una homología del 72% entre ellas y tiene algunos segmentos donde las secuencias de los nucleótidos son completamente iguales.

Esta última región está compuesta, en su mayoría, por nucleótidos de adenina [A] y timina [T]. En el caso de otras citocinas, linfocinas y protoncogenes, las secuencias repetidas de estos dos nucleótidos han sido relacionadas con la destrucción específica de sus RNAm, por lo que se piensa que, en el caso del RNAm de la IL-6, la acumulación de nucleótidos de A y T en la región 3' del gene para la IL-6, pudiera servir para regular su estabilidad (296).

#### 4. 2. 2. Control de la expresión del gene de la IL-6.

El gene humano para la IL-6 tiene varios sitios de iniciación de la transcripción. Los tres primeros de ellos han sido denominados C1, C2 y C3, encontrándose ubicados alrededor de los nucleótidos -63 a -64, -86 a -88 y -176, respectivamente. El gene de la IL-6 posee, además, otras tres secuencias, parecidas a la secuencia 'TATA', en las que también se puede iniciar su transcripción. Estas últimas, al igual que las anteriores, flanquean la región 5' y están localizadas entre los nucleótidos -92 a -85, -115 a -109 y -207 a -201 <sup>(346)</sup>.

El sitio C1 ha sido identificado por Zilberstein *et al* <sup>(352)</sup> y por Haegeman *et al* <sup>(86)</sup>, en 1986, como el segmento donde se inicia la transcripción del gene de la IL-6, en los fibroblastos estimulados con poli-I, poli-C y cicloheximida. Cada uno de los sitios de iniciación de la transcripción puede ser estimulado por diferentes sustancias y la utilización predominante de cada uno de ellos tiene relación con la expresión del gene de la IL-6 en diversos tejidos <sup>(346)</sup>.

#### 4. 2. 3. El promotor del gene de la IL-6.

En la región 5' del gene de la IL-6 humana y murina, donde se encuentra el promotor de su expresión, se han encontrado segmentos con secuencias de nucleótidos similares a las de varios "elementos sensibles" a diversas sustancias, los cuales son conocidos como facilitadores de la transcripción. Dichas secuencias se localizan entre los nucleótidos -225 a -111 y, probablemente, constituyen los principales segmentos del gene que regulan la síntesis de la IL-6 <sup>(231)</sup>.

Estas secuencias que posee el promotor del gene de la IL-6, tanto humano como murino, son similares a otros elementos sensibles aumentadores de la transcripción. Las más importantes son las secuencias similares a las del elemento sensible a suero [SRE] del gene c-fos, la secuencia del elemento sensible a AMPc [CRE] (la cual pudiera ser la responsable de la inducción del gene de la IL-6 por este nucleótido cíclico), un par de secuencias que son un ligando para la proteína activadora-1 [AP-1] (un factor enlazante de DNA que participa en la inducción de la transcripción de este gene por los ésteres de forbol), las secuencias para el elemento sensible a glucocorticoides [GRE] y



de este gene por el IFN <sup>(296)</sup>. En líneas generales, los agentes que facilitan la acumulación del RNAm de la IL-6 son los mismos que activan las proteínas cinasas A y C o que aumentan la concentración intracitoplasmática de AMPc. En cambio, los glucocorticoides regulan negativamente la expresión del gene de esa misma citocina <sup>(236, 296)</sup>.

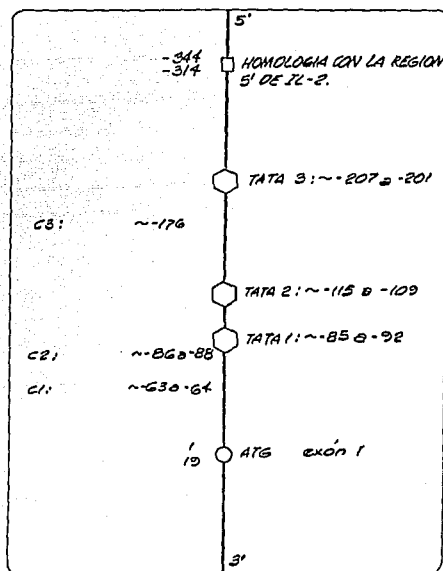


Figura 6. Esquema que muestra la ubicación aproximada de los sitios (C1, C2 y C3) de iniciación de la transcripción en el promotor del gene de la IL-6, según Yasukawa *et al* (346). Los números a la izquierda señalan la localización de los nucleótidos, desde el comienzo de la región flanqueante 5' hasta el inicio del primer exón que codifica para la IL-6. A la derecha se presenta la ubicación aproximada de las 3 secuencias similares a 'TATA', en las cuales también se puede iniciar la transcripción de este gene.

En la región (-225 a -111) también se inicia la inducción de la síntesis de la IL-6, como una respuesta a infecciones por los virus de pseudorrabia y Sendai <sup>(230)</sup>. Además, tanto el gene humano como el murino contienen regiones ricas en los nucleótidos guanina [G] y citocina [C], cuya acumulación en ciertos segmentos parece ser necesaria para la transcripción eficaz de genes eucariotes <sup>(296)</sup>.

La región del promotor del gene de la IL-6 que está comprendida entre los nucleótidos -170 y -124, comparte una homología del 70% con las secuencias del promotor del gene de c-fos, ubicadas entre los nucleótidos -326 y -277. Ambos promotores contienen al SRE y una de las secuencias que son un ligando para la proteína activadora AP-1.

Asimismo, en esta misma región flanqueante 5' del promotor del gene de la IL-6, existen otras secuencias de nucleótidos que son sensibles a las señales generadas por una variedad de citocinas, virus y agonistas de segundos mensajeros. Entre los pares de bases -173 y -151, están los elementos sensibles que son responsables de la inducción de la expresión del gene de la IL-6 por el suero, la IL-1 $\alpha$ , el TNF, el activador forskolin y el diéster de forbol conocido como TPA. Por esta razón, a toda esa región se le ha denominado "elemento sensible múltiple" [MRE]. El MRE del gene de la IL-6 también puede unirse con varias proteínas nucleares y con los mismos factores que facilitan la inducción de la expresión del gene c-fos <sup>(231)</sup>.

Se ha demostrado que, dentro de la región MRE, la secuencia CGTCA es necesaria para la inducción del gene de la IL-6 con el éster de forbol TPA (que activa la proteína cinasa C) y con forskolin (un activador de la proteína cinasa A), mientras que otras secuencias son las responsables de la inducción del mismo gene por suero, por la IL-1 $\alpha$  y por el TNF (que aumentan la concentración intracelular de AMPc). Asimismo, Ray *et al* <sup>(231)</sup> señalaron en 1989 que la región comprendida entre los nucleótidos -225 y -164, dentro del promotor del gene de la IL-6, podía participar en el control negativo de la síntesis de esta interleucina. Se cree que todas estas secuencias ejercen un efecto importante en la activación de la transcripción en este gene.

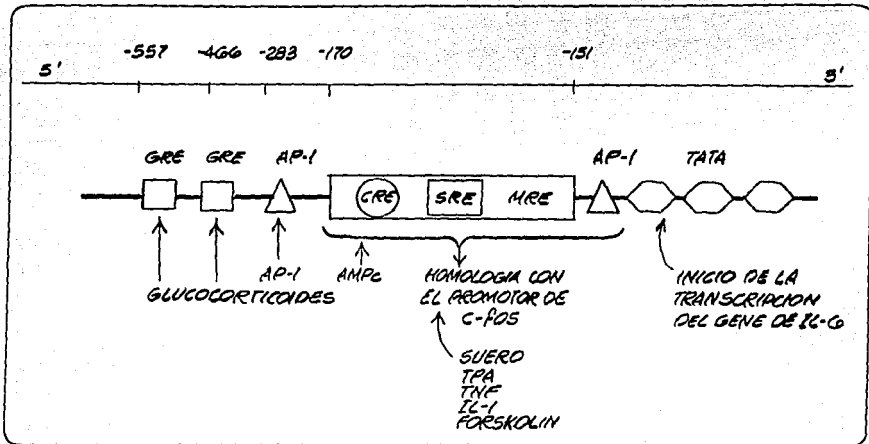


Figura 7. Esquema de la región flanqueante 5' del gen humano de la IL-6, en el que se muestra la ubicación aproximada del elemento sensible múltiple [MRE], de las secuencias similares al elemento sensible a suero [SRE] del gene c-fos y de las secuencias complementarias que son un ligando para la proteína activadora AP-1. Modificado de Ray *et al* (231).

Los genes de la IL-6 y de c-fos se activan y se transcriben rápidamente. En estos dos genes, la regulación de la transcripción se lleva a cabo de una manera similar (132). Los promotores de ambos genes son funcionalmente parecidos, están transreprimidos por la proteína nuclear Fos y se activan por los mismos inductores. Sin embargo, la regulación precisa entre ambos promotores es diferente y específica. La expresión de ambos genes está regulada por una gran variedad de estímulos y ninguno de los dos promotores necesita la síntesis previa de proteínas para activarse (231).

Además, la región flanqueante 5' del gene de la IL-6 contiene una secuencia de 31 nucleótidos, ubicada entre las posiciones -344 y -314, que es muy parecida a una secuencia localizada en el promotor del gene de la IL-2 (346). Otro conjunto particular de nucleótidos que también están presentes en el promotor del gene de la IL-6 es la secuencia GGGATTTTCC, la cual pudiera ser un sitio potencial de unión al factor nuclear NF- $\kappa$ B (promotor de la multiplicación de algunos virus, como el VIH y el citomegalovirus), que está localizada entre los nucleótidos -75 y -66 (231). Estas últimas secuencias son mencionadas muy poco en la literatura sobre la IL-6. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B tiene una participación importante en la regulación de las reacciones

inflamatorias y en la producción de anticuerpos. El NF- $\kappa$ B preexiste en el citoplasma en una forma inactiva, conjugado a proteínas inhibitoras llamadas I $\kappa$ B. Una gran variedad de estímulos inflamatorios parecen activar al NF- $\kappa$ B al provocar la disociación del complejo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B y la subsiguiente translocación del último compuesto al núcleo, donde se une a las secuencias de los genes que son su blanco.

#### 4. 2. 4. Factores nucleares que son inductores de IL-6.

Durante 1990, Akira *et al* <sup>(6)</sup> encontraron un factor nuclear que se une al elemento sensible a IL-1, del promotor del gene de la IL-6. A este factor se le conoce como factor nuclear de la IL-6 [NF-IL6]. Es una proteína que consta de 345 aminoácidos, con una estructura de cierre de leucina. No se produce bajo condiciones normales, pero su síntesis aumenta en el curso de infecciones virales o bacterianas, así como en cualquier situación que implica destrucción de tejidos del huésped. La porción COOH-terminal de esta proteína posee gran homología con otro factor nuclear transcripcional, producido en el hígado de rata, llamado C/EBP, así como con factores que facilitan la transcripción de los oncogenes c-fos y myc.

Además de unirse a elementos sensibles del promotor del gene de la IL-6, el NF-IL6 puede acoplarse a regiones regulatorias transcripcionales de los genes de varias proteínas de fase aguda (como la haptoglobina, la hemopexina y la  $\alpha$ 1-glucoproteína ácida) y también a los genes de algunas citocinas como el TNF, la IL-8 y el G-CSF. Asimismo, este factor nuclear se une fuertemente a la secuencia CCAAT, a las secuencias facilitadoras de la transcripción del núcleo viral, así como a secuencias aumentadoras de la multiplicación del HIV. El NF-IL6 también activa ciertos provirus.

El NF-IL6 es un factor transcripcional positivo que se expresa en todos los tejidos, después de la estimulación de las células con los LPS o endotoxinas de las bacterias Gram negativas. Muchas líneas celulares lo expresan de manera constitutiva y su RNAm se induce más rápidamente que el RNAm de la IL-6. Otros inductores conocidos del NF-IL6 son la propia IL-6 y la IL-1, en células hepáticas de ratón.

En 1990, Poli *et al* <sup>(224)</sup> informaron sobre la existencia de una nueva proteína nuclear, llamada proteína ligante al DNA dependiente de IL-6 [IL-6DBP] que, como su nombre lo indica, es capaz de formar complejos DNA-proteína. Se une a los segmentos

de nucleótidos que forman los elementos sensibles del promotor del gene de la IL-6 [IL-6 RES] que también están presentes en el promotor de los genes de algunas proteínas positivas de fase aguda, ya sea en forma de homo o heterodímero (con C/EBP), por lo que se le ha considerado un activador de la transcripción de todas estas proteínas.

El gene para la IL-6DBP se encuentra ubicado en el cromosoma 20 de los humanos y en el cromosoma 3 de las ratas<sup>(287)</sup>. La proteína codificada por este gene está compuesta por 345 aminoácidos en el hombre y 297 en la rata; ambas proteínas poseen un dominio de cierre de leucina. El RNAm para el IL-6DBP es más abundante en células hepáticas que en otros tejidos, aunque también se le ha encontrado en músculo, corazón y tiroides. Esta proteína es inactiva por sí sola, pero su transcripción se puede activar e inducir con IL-6. Poli *et al* <sup>(224)</sup> opinan que la IL-6DBP es distinta a la NF-IL6, aunque ambas moléculas parecen formar parte de una familia de proteínas relacionadas con el C/EBP.

#### 4. 3. La proteína.

##### 4. 3. 1. Composición de aminoácidos.

El DNAc de la IL-6 humana contiene la información necesaria para la síntesis de una molécula precursora formada por 212 residuos de aminoácidos [aa], con una señal hidrofóbica compuesta por 28 de ellos, que son necesarios para su secreción <sup>(97)</sup>. La molécula madura de la IL-6 humana contiene 185 aa, de los cuales solamente 4 son residuos de cisteína <sup>(330)</sup>. IL-6 también tiene dos sitios potenciales de N-glucosilación. Hasta el momento de terminar la revisión de la bibliografía para este trabajo, no se encontraron referencias sobre la estructura tridimensional de esta proteína.

La IL-6 humana, obtenida en el sobrenadante de cultivos de células T, fibroblastos y células mononucleares de sangre periférica, es una glucoproteína de una sola cadena, con un PM que varía entre 21-28 kDa, según la fuente y la preparación <sup>(330)</sup>. Así por ejemplo, la rIL-6 obtenida en *E. coli*, y purificada por inmunofinidad con anticuerpos monoclonales ligados a sulfonil Sepharosa, tiene un PM de 21 kDa <sup>(335)</sup>. Sin embargo, otros autores <sup>(20, 326)</sup> han informado que cuando la IL-6 humana o murina se obtienen por cromatografía a través de un gel, utilizando una solución amortiguadora con NaCl 0.1 a 0.2 M, las moléculas de IL-6 eluyen como si fueran varias fracciones, con pesos

moleculares entre 25 y 35 kDa. Existen algunas formas de la IL-6 que migran rápidamente entre los 19/21 kDa, que han sido encontradas en los productos de secreción de una línea de células T transformadas por el HTLV-1, probablemente como un resultado de la remoción de los residuos de ácido siálico unidos en O-, mediante tratamiento con un ácido débil (235).

La heterogeneidad en los pesos moleculares de IL-6, que ha sido informada por diversos autores, probablemente depende de una variabilidad en el número de las N- y O-glucosilaciones de los residuos de serina, lo mismo que de las fosforilaciones y las sializaciones. Estas son transformaciones postraduccionales de la IL-6, que no resultan necesarias para que la molécula sea biológicamente activa (270, 330).

Cuando se obtiene de células homólogas a las mencionadas en los párrafos anteriores, la IL-6 de ratón tiene un PM que varía entre 22-29 kDa, aunque sólo presenta sitios de O-glucosilación en la serina (37). El DNAC de la IL-6 murina, obtenido de una línea de células TH o de una línea celular derivada del estroma de la médula ósea, codifica para la síntesis de una proteína de 211 aa, con una señal hidrofóbica compuesta por 24 residuos de aa (330). La siguiente Figura muestra las secuencias de aminoácidos de las IL-6 humana (h) y murina (r) y, además, señala con un asterisco aquellos que ocupan la misma posición en ambas moléculas.

```

-24
(r) Met Lys Phe Leu Ser Ala Arg Asp Phe His Pro Val Ala Phe ---
   *           *           *           *   *   *   *
-27
(h) Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser

(r) Leu Gly Leu Met Leu Val Thr Thr Thr Ala Phe Pro Thr Ser Gln
   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
(h) Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro ---

(r) Val Arg Arg Gly Asp Phe Thr Glu Asp --- Thr Thr Pro Asn Arg
   *           *           *           *   *   *
(h) Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg

                                     32
(r) --- Pro Val Tyr Thr Thr Ser Gln Val Gly Gly Leu Ile Thr
   *                                     *   31
(h) Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg

```

(r) His Val Leu Thr Glu Ile Val Glu Met Arg Lys Glu Leu Cys Asn  
 \* \* \* \* \*

(h) Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn  
 +++

(r) Gly Asn Ser Asp Cys Met Asn Asn Asp Asp Ala Leu Ala Glu Asn  
 \* \* \* \* \*

(h) Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn  
 +++ +++

(r) Asn Leu Lys Leu Pro Glu Ile Gln Arg Asn Asp Gly Cys Thr Gln  
 \* \* \* \* \*

(h) Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln

91

(r) Thr Gly Tyr Asn Gln Glu Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Ser  
 \* \* \* \* \*

(h) Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr

(r) Gly Leu Leu Glu Tyr His Ser Tyr Leu Glu Tyr Met Lys Asn Asn  
 \* \* \* \* \*

(h) Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg

(r) Leu Lys Asp Asn Lys Lys Asp Lys Ala Arg Val Leu Gln Arg Asp  
 \* \* \*

(h) Phe --- Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser

(r) Thr Glu Thr Leu Ile His Ile Phe Asn Gln Glu Val Lys Asp Leu  
 \* \* \* \* \*

(h) Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu

150

(r) His Lys Ile Val Leu Pro Thr Pro Ile Ser Asn Ala Leu Leu  
 \* \* \* \* \*

148

(h) Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu  
 +++ +++ +++

(r) Thr Asp Lys Leu Glu Ser Gln Lys Glu Trp Leu Arg Thr Lys Thr  
 \* \* \* \* \*

(h) Thr Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr

(r) Ile Gln Phe Ile Leu Lys Ser Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr  
 \* \* \* \* \*  
 (h) Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser

187  
 (r) Leu Arg Ser Thr Arg Gln Thr  
 \* \* \* \* \*  
 (h) Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met  
 185

**Figura 8. Secuencia de aminoácidos de las IL-6 humana y murina, según Van Snick (330).**

(r) = IL-6 de ratón  
 (h) = IL-6 humana  
 — = péptidos señal  
 cys = residuos de Cys para formar puentes disulfuro  
 + + + = sitios de N-glicosilación  
 \* = aa iguales  
 números = posición de los aminoácidos en la proteína madura

Al ser comparada con la IL-6 de ratón y de rata, la IL-6 humana muestra su mayor divergencia en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal. La porción central conserva completamente la posición de los 4 residuos de cisteína y es la que presenta la mayor homología (57%) con la IL-6 de ratón. Entre los aa 51 y 74 (IL-6 humana) y 52 y 75 (IL-6 de ratón), se encuentran 9 residuos de aa que tienen la misma localización en las dos moléculas. Los cuatro residuos de cisteína permiten la formación de los dos puentes disulfuro que contienen ambas proteínas, localizándose el primer puente entre las cisteínas 46 y 52 y el segundo entre las cisteínas 75 y 85, en la IL-6 murina (330). Se ha observado que los puentes disulfuro contribuyen al mantenimiento de la conformación biológicamente activa de la rIL-6 humana (270). Por otra parte, los dos sitios potenciales de N-glicosilación que posee la IL-6 humana (Asn-X-Ser y Asn-X-Thr), se han identificado en los residuos de los aminoácidos números 45 a 47 y 144 a 146, respectivamente (97).

En la siguiente tabla se resumen algunas de las propiedades fisicoquímicas más relevantes de la molécula de la IL-6 producida en ratones o en humanos, según Kishimoto (132) y Van Snick (330).



TABLA IV. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA IL-6 HUMANA Y MURINA.

| CARACTERISTICA                          | hIL-6 | mIL-6 |
|---|-------|-------|
| Peso molecular aparente (kDa)           | 23-30 | 22-29 |
| Número de aminoácidos (total)           | 212   | 211   |
| Número de aminoácidos (proteína madura) | 185   | 187   |
| Estructura genómica : exones            | 5     | 5     |
| intrones                                | 4     | 4     |
| Localización : cromosoma                | 7     | 5     |
| Sítios de N-glucosilación               | 2     | -     |
| Enlaces disulfuro                       | 2     | 2     |
| Homología de secuencia                  | G-CSF |       |

#### 4. 3. 2. Variedades de la IL-6.

La IL-6 humana que es secretada por fibroblastos y monocitos parece ser un conjunto de, al menos, 5 isoformas que, en sus presentaciones más comunes tienen PM entre los 23 y los 30 kDa. Asimismo, existen otras variedades de la IL-6, de mayor PM que las anteriores, que han sido consideradas como formas multiméricas <sup>(91, 177, 235, 260)</sup>.

Utilizando sistemas electroforéticos en gel, con agentes desnaturizantes como el SDS, en el sobrenadante de cultivos de fibroblastos o monocitos estimulados con RNA de doble cadena [dsRNA], se han identificado 5 isoformas de IL-6. Las tres primeras fueron caracterizadas porque tienen un corrimiento electroforético similar y forman tres bandas (un triplete) de proteínas con un PM aproximado a los 29 kDa. Estas IL-6 están glucosiladas y su secreción se incrementa añadiendo cicloheximida al medio de cultivo de los fibroblastos; sin embargo, su inducción se inhibe en presencia del antibiótico tucamicina. Las otras dos isoformas de IL-6 se revelan como dos bandas cercanas (un doblete) con un PM aproximado de 25 kDa, que no poseen carbohidratos y que se pueden sintetizar en presencia de tucamicina <sup>(177)</sup>.

La síntesis de las isoformas de la IL-6 que tienen PM entre 23 y 30 kDa se puede inducir *in vitro* mediante la estimulación de fibroblastos cultivados con IL-1 $\alpha$ , TNF o LPS, aunque también se ha observado su producción en ausencia de estímulos. Los monocitos estimulados con LPS o IL-1 $\alpha$  igualmente producen varias formas de la IL-6,

con PM similares a las que son sintetizadas por los fibroblastos. En este último caso, las IL-6 más abundantes son las del doblete cercano a los 25 kDa, encontrándose que se trata de moléculas fosforiladas (178, 235). En 1988, Ray *et al* (231) informaron que los fibroblastos y los monocitos pueden producir las fosfoproteínas de IL-6 que tienen un PM de 23-30 kDa, sólo que las de 28-30 kDa se encuentran poco fosforiladas. Asimismo, mencionan que las moléculas con los PM más bajos, entre 23 y 25 kDa, sólo están O-glucosiladas, mientras que las de 28-30 kDa se encuentran tanto O- como N-glucosiladas. Por otro lado, existen formas de IL-6 de mayor PM, entre los 45 y los 65-70 kDa, que son resistentes a la desnaturalización por electroforesis en gel con SDS y que pueden ser identificadas fácilmente con anticuerpos anti-IL-6, después de su transferencia a tiras de nitrocelulosa (235).

En el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y en el suero de voluntarios, sanos, que fueron inyectados con TNF o LPS, se ha observado la isoforma de IL-6 que tiene un PM de 45 kDa y que ha resultado biológicamente activa. La misma presentación de dicha molécula ha sido encontrada en el sobrenadante de cultivos de fibroblastos y células endoteliales estimulados con TNF o con IL-1 (122). Los monocitos cancerosos de la línea THP-1 sintetizan las isoformas de 23 y 42 kDa de IL-6, las cuales han sido identificadas por cromatografía de afinidad y western blotting (245).

Las isoformas de IL-6 con PM de 65-70 kDa parecen ser complejos diméricos que se disocian en monómeros de 23-25 kDa. Han sido encontrados en el suero de pacientes con infecciones bacterianas, abundan en el sobrenadante del cultivo de ciertas células de ovario de hamster chino y, además, se producen poco en los cultivos de fibroblastos estimulados con dsRNA. En los cultivos de queratinocitos estimulados con diéster de forbol [PMA] o con IL-1, estas formas de la IL-6 de mayor PM (45, 65/70 kDa) se presentan como fosfoproteínas unidas a la membrana de las células (235). Sin embargo, todas las variedades de la IL-6 han sido observadas en los fluidos biológicos de pacientes con infecciones bacterianas (91). Matsuda *et al* (172) opinan que las diferentes isoformas de IL-6 circulan en el suero formando complejos con la  $\alpha 2$ -macroglobulina [ $\alpha 2M$ ] y que ésta última no interfiere con la actividad de las primeras, de acuerdo con los resultados de sus estudios realizados en 1989.

La Tabla siguiente muestra las diversas formas de la IL-6 que han sido encontradas hasta ahora, los agentes inductores de las mismas y las células que las producen, según Helfgott *et al* (91) y Revel (235).

TABLA V. VARIEDADES DE LA IL-6

| ISOFORMA (kDa) | INDUCTOR   | PRODUCTOR  |
|----------------|--|--|
| 19/21          | HTLV-1   | línea de células T   |
| 23/25 y 26/30  | IL-1 $\alpha$ ,<br>TNF,<br>LPS,<br>INF $\gamma$  | fibroblastos,<br>endometrio,<br>monocitos normales y<br>cancerosos   |
| 42/45          | IL-1,<br>TNF,<br>LPS,<br>PMA                     | suero de voluntarios,<br>pacientes con artritis<br>reumatoide,<br>fibroblastos,<br>células endoteliales,<br>monocitos cancerosos |
| 65/70          | infecciones bacterianas,<br>dsRNA,<br>PMA o IL-1 | queratinocitos,<br>pacientes,<br>fibroblastos,<br>cél. de ovario de<br>hamster chino   |

#### 4. 3. 3. Relación estructura-actividad.

La IL-6, como muchas otras proteínas, manifiesta una relación estrecha entre estructura y actividad. En 1991, Snouwaert *et al* (270) demostraron que la rIL-6 humana reduce sus actividades biológicas de una manera considerable cuando se le sustituyen los residuos de cisteína por residuos de serina. Los porcentajes de actividad que se conservaron en la IL-6 con las cisteínas sustituidas fueron :

1. Menos del 0. 01% de su capacidad para estimular la producción de IgM, en una línea de linfocitos B humanos, transformados con el EBV.
2. Sólo el 0. 1% de su capacidad para la inducción de la secreción de fibrinógeno, en hepatocitos humanos.
3. Únicamente el 3.0% de su capacidad para la inducción de la proliferación de una línea celular de hibridoma murino.
4. El 20% de su capacidad para estimular la producción de fibrinógeno en las células de un hepatoma de rata.



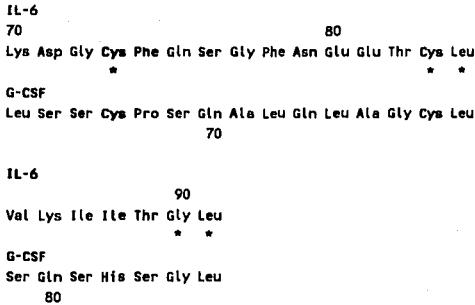


Figura 9. Similitudes entre las secuencias de aminoácidos de IL-6 y G-CSF humanos, modificado de Kishimoto <sup>(132)</sup>.

Cys = residuos de Cys que forman puentes disulfuro  
\* = aminoácidos iguales  
números = posición de los aa.

Además de lo anterior, la IL-6 comparte con el G-CSF una homología significativa en la organización de su gene. Ambas proteínas están codificadas por el mismo número de intrones y de exones y, además, el tamaño de cada exón es notablemente parecido, lo cual le ha permitido a Kishimoto <sup>(132)</sup> sugerir que las dos proteínas pueden tener un gene ancestral común.

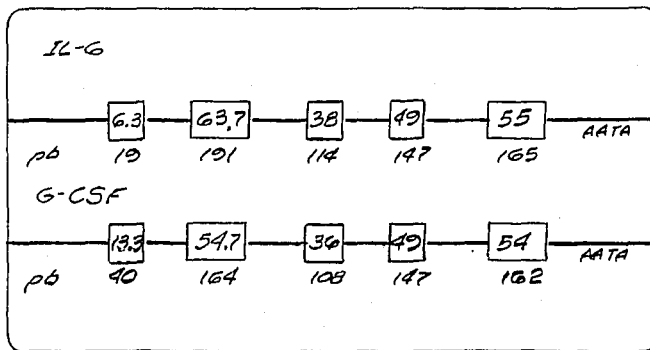


Figura 10. Similitudes entre la localización y el tamaño (cantidad de pares de bases o pb) de los exones, en los genes de IL-6 y G-CSF. Modificado de Kishimoto <sup>(132)</sup>.

#### 4. 4. Origen celular.

La IL-6 puede ser producida por varios tipos de células diferentes, ya sean linfoides o no linfoides, entre las que se pueden mencionar los linfocitos TH<sub>2</sub> y B, los fibroblastos, las células cebadas, las células endoteliales, los monocitos y/o macrófagos, algunas líneas de células T malignizadas, los queratinocitos, las células del estroma de la médula ósea, las células epiteliales, las células de la pituitaria anterior, las células del endometrio y varias líneas de células tumorales <sup>(330)</sup>.

Los principales productores de esta interleucina *in vitro* son las células accesorias de la respuesta inmunitaria, así como algunas líneas de células TH<sub>2</sub> de ratón y las células foliculo estrelladas de la hipófisis anterior <sup>(330)</sup>. Los linfocitos T y B obtenidos de la sangre circulante son otras células que, *in vitro*, también son productoras de IL-6, aunque en menor cantidad que las anteriores. Se ha comprobado que, *in vivo*, estas últimas células producen IL-6 cuando infiltran el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Las células del hueso y del endometrio también la producen, bajo control hormonal <sup>(48, 62, 289)</sup>. En el medio de cultivo, las células T necesitan la presencia de monocitos para producir la IL-6 <sup>(132, 143)</sup> en tanto que éstos últimos parecen no requerir de un estímulo aparente para iniciar la síntesis de la interleucina <sup>(2, 177, 203)</sup>.

Otra fuente de IL-6 la constituyen las células endoteliales humanas <sup>(211)</sup>. Jirik *et al* <sup>(125)</sup>, en 1989, han comprobado que, *in vitro*, las células endoteliales de la vena umbilical humana [HUVEC] secretan IL-6 cuando son estimuladas con LPS, en una forma dependiente de la dosis. La cantidad de la interleucina en el sobrenadante puede ser reducida por la adición de polimixina B al medio de cultivo y neutralizada con anticuerpos policlonales anti-IL-6. Este fenómeno estimulador de la secreción de IL-6 también se presenta al agregar al medio de cultivo otros mediadores de las reacciones inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la LT.

Por otra parte, los trabajos publicados por el grupo de Navab *et al* <sup>(202)</sup>, en 1991, demostraron que, *in vitro*, los cocultivos de células endoteliales y células del músculo liso, provenientes de la aorta humana y en presencia de monocitos, liberan al medio varias citocinas entre las que se encuentran principalmente la IL-1 y la IL-6. Estas últimas fueron parcialmente responsables del aumento en la síntesis de las proteínas de la matriz celular, fibronectina y colágena, 22 y 1.9 veces más, respectivamente. La síntesis de la primera se inhibió en un 67% en presencia de los anticuerpos anti-IL-6.

Asimismo, en estos cultivos se incrementó la síntesis de RNAm para la conexina 43. La observación anterior es consistente con los resultados de otros estudios en los que se menciona la participación de las interleucinas de leucocitos en la inducción de la matriz celular de células endoteliales cultivadas; en el incremento de la producción de fibronectina por hepatocitos cultivados y estimulados con IL-6; en la producción de fibronectina por los hepatocitos estimulados con IL-1<sup>(87)</sup> y, finalmente, en la demostración de que la IL-6 es la responsable del aumento en la síntesis de fibronectina por los hepatocitos de rata, en un medio de cultivo condicionado con el sobrenadante de un cultivo de monocitos estimulados<sup>(147)</sup>.

Villiger y colaboradores<sup>(331)</sup> han observado que, normalmente, son pocas las células T que producen IL-6 en los tejidos de los órganos linfoides y que, por lo general, la cantidad sintetizada es mínima. Entre los tejidos linfoides que producen las mayores cantidades de IL-6 están las zonas interfoliculares y subepiteliales de las amígdalas, en donde la citocina es sintetizada por las células del parénquima. Otras células T que fueron identificadas por este grupo de investigadores como productoras de IL-6 se encontraban dentro de la capa epitelial de las criptas. En cambio, otros autores<sup>(348)</sup> han demostrado que las células de los ganglios linfáticos de un paciente con la enfermedad de Castleman producen grandes cantidades de IL-6. En este caso, las células productoras de la citocina estaban ubicadas en el seno marginal y en las áreas interfoliculares que, además, presentaban proliferación vascular y estaban infiltradas por histiocitos y células plasmáticas.

Recientemente, los estudios de Schrader *et al*<sup>(252)</sup> mostraron, al igual que los de Loppnow y Libby en 1990<sup>(160)</sup>, que los sobrenadantes de los cultivos de células del músculo liso vascular [VSMC], en medio libre de suero, suplementado con insulina, transferrina y albúmina, contenían grandes cantidades de IL-6 y otras citocinas. Las células provenían de las arterias mesentéricas de ratones MRL<sup>+/+</sup>, MRL<sup>lpr/lpr</sup>, CBA/J y de algunas clonas de VSMC. La IL-6 del sobrenadante pudo ser neutralizada con anticuerpos monoclonales 6B4 anti-IL-6 producidos por linfocitos de rata. Los cultivos de células de ratón C3H/HeJ (una cepa de animales que no responden a la estimulación con LPS) produjeron menos IL-6 que los cultivos arriba mencionados. Al estudiar el origen de la IL-6, otros investigadores<sup>(331)</sup> han confirmado que tanto las clonas de células TH murinas como las clonas CD8<sup>(+)</sup> aloreactivas producen cantidades mínimas de IL-6. Por otra parte, Horii *et al*<sup>(112)</sup> han informado en 1988 que, la producción *in vitro* de IL-6

por los linfocitos T, es inducida por PHA/TPA y depende de la presencia de macrófagos en el medio.

La producción máxima del RNAm de la IL-6 se alcanza a las 5 horas en un cultivo de monocitos, mientras que los linfocitos T necesitan 24 a 48 horas, después de iniciado el cultivo. Esto sugiere que la IL-6 producida por estos distintos tipos celulares pudiera tener efectos distintos, en diferentes fases de la respuesta inmune <sup>(132)</sup>.

TABLA VI. CELULAS PRODUCTORAS DE IL-6 \*

| Células normales      | Líneas celulares | Células tumorales         |
|-----------------------|------------------|---------------------------|
| Linfocitos T,         | líneas T (1)     | Mixoma cardíaco           |
| Linfocitos B          | U937 (2)         | Mieloma                   |
| Fibroblastos,         | P388D1 (2)       | Hipernefroma              |
| Monocitos,            | MG63 (3)         | Insulinoma                |
| Queratinocitos,       | T24 (4)          | Adenocarcinomas :         |
| C. endoteliales,      | A549 (5)         | mamario, colónico,        |
| Astroцитos,           | SK-MG-4 (6)      | ováico, endometrial,      |
| C. del estroma de     | U373 (7)         | Linfomas Hodgkin y        |
| médula ósea,          |                  | no Hodgkin                |
| C. del mesangio,      |                  | Carcinomas : de próstata, |
| C. FE de la hipófisis |                  | tejido epidérmico         |
| C. cebadas            |                  | y de vejiga               |
| C. endometriales      |                  |                           |
| C. del hueso          |                  |                           |
| C. del músculo liso   |                  |                           |
| C. β de los islotes   |                  |                           |
| de Langerhans         |                  |                           |

- (1) linfocitos T transformados por el HTLV-1  
 (2) líneas celulares de monocitos  
 (3) línea celular de osteosarcoma  
 (4) línea de carcinoma de vejiga  
 (5) línea de carcinoma de pulmón  
 (6) línea de glioblastoma  
 (7) línea de astrocitoma

\* = según varios autores  
 C. = células



Desde 1989 existe evidencia de que las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas también producen IL-6. Los trabajos realizados por el grupo de Campbell <sup>(32)</sup> han revelado que los cultivos de islotes de páncreas murino sintetizan esta interleucina. Su producción se incrementa 6 veces cuando es inducida por el IFN $\gamma$ ; 40 veces si al medio de cultivo se adiciona TNF $\alpha$  y hasta 115 veces si las dos citocinas se añaden juntas. Estos incrementos fueron dependientes de la dosis y del tiempo de exposición, encontrándose, además, que la máxima formación de RNAm para la IL-6 ocurrió tempranamente. Asimismo, en el sobrenadante del cultivo de células de insuloma de rata RIN-m5F también se ha demostrado actividad de IL-6, cuando a las células tumorales se les adiciona TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Estos trabajos sobre la IL-6 y el páncreas condujeron a la observación de otro hecho interesante. Las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas de ratón, cultivadas en presencia de rIL-6, liberan grandes cantidades de insulina, en una forma que también resultó ser dependiente de la dosis de la citocina añadida al medio de cultivo.

#### 4. 5. Receptor de la IL-6.

El receptor para la IL-6 [IL-6R] es una típica proteína de membrana que tiene una parte de la molécula colocada intracitoplasmáticamente mientras la otra se expone al exterior de la célula. Por esta razón, el IL-6R permite la transmisión de señales desde el medio externo hacia el citoplasma y el núcleo. Su estructura se identificó clonando su DNAc, en las células COS7 de mono <sup>(343)</sup>.

##### 4. 5. 1. Aislamiento y localización cromosómica del IL-6R.

La ubicación cromosómica del gene para el receptor de la IL-6 ha sido identificada recientemente. En el hombre, este gene se localiza en el cromosoma 1, mientras que en la rata se encuentra en el cromosoma 2 <sup>(287)</sup>.

Los estudios realizados en la línea de células YT, parecidas a las NK, han mostrado que el RNAm del receptor para la IL-6 está compuesto de aproximadamente 5,000 nucleótidos. Es similar en longitud a otros RNAm para éste mismo receptor, que han sido obtenidos de los extractos de RNA en la línea celular de mieloma U266, en la línea celular de leucemia histiocítica U937 y en la línea de células B CESS, transformadas por el virus de Epstein-Barr [EBV] <sup>(343)</sup>.

#### 4.5.2. Caracterización del IL-6R.

Hirata y colaboradores <sup>(104)</sup> han realizado varios estudios, con linfocitos T y B, para tratar de determinar la estructura del receptor de la IL-6, usando dos clases de anticuerpos (policlonales y monoclonales) específicamente dirigidos contra la molécula. La inmunoprecipitación obtenida con dichos anticuerpos los llevó a demostrar que la molécula madura del IL-6R es una glucoproteína que tiene un PM de 80 kDa, el cual se reduce a 50 kDa después de un tratamiento con enzimas como las N- y O-gluconasas y las neuraminidasas.

La molécula del IL-6R está compuesta por 468 aa, con dos regiones hidrofóbicas principales, ubicadas entre los residuos de aa 1-20 y los residuos 359-386. Los fragmentos anteriores corresponden a un péptido señal presuntivo y al segmento transmembranal de esta glucoproteína, respectivamente. El receptor de la IL-6 posee 6 posibles sitios de N-glicosilación (5 sitios en el dominio extracelular y uno en el dominio intracelular) y 11 residuos de cisteína <sup>(132, 330, 343)</sup>. En la siguiente Figura se muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que conforman a la molécula del receptor de la IL-6 en el hombre.

---

```

1 ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG
1 Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala
  *

46 CCG GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CCG TGC CCT GCG CAG GAG GTG
16 Pro Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val
  *

91 GCA AGA GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG
31 Ala Arg Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu

136 AQC TGC CCG GGG GTA GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG
46 Thr Cys Pro Gly Val Glu Pro Gly Asp Asn Ala Thr Val His Trp
  *
  + + + + + + +

181 GTC CTC AGG AAG CCG GCT GCA GGC TCC CAC CCC AGC AGA TGG GCT
61 Val Leu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala

226 GGC ATG GGA AGG AGG CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC
76 Gly Met Gly Arg Arg Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp

271 TCT GGA AAC TAT TCA TGC TAC CCG GCC GGC CCG CCA GCT GGG ACT
91 Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr
  + + + + + + + *

```

316 GTG CAC TTG CTG GTG GAT GTT CCC GAG GAG CCC CAG CTC CAC GAC  
 106 Val His Leu Leu Val Asp Val Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser

361 TGC TTC CCG AAG AGC CCC CTC AGC AAT GTT GTT TGT GAG TGG GGT  
 121 Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly  
 \*

406 CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA AAG GCT GTG CTC TTG GTG  
 136 Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr Lys Ala Val Leu Leu Val

451 AGG AAC TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC TTC CAG GAG CCG TGC  
 151 Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu Pro Cys  
 \*

496 CAG TAT TCC CAG GAG TCC CAG AAG TTC TCC TGC CAG TTA GCA GTC  
 166 Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala Val  
 \*

541 CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG TCC ATG TGC GTC GCC  
 181 Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met Cys Val Ala  
 \*

596 AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC TTT CAG GGT  
 196 Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe Gln Gly

631 TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC ACT  
 211 Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val Thr  
 \*  
 +++ +++ +++

676 GCC GTG GCC AGA AAC CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGC CAA GAC  
 226 Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp

721 CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA CTA CGG TTT GAG CTC  
 241 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu  
 +++ +++ +++

746 AGA TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC  
 256 Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val

811 AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC  
 271 Lys Asp Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly  
 \*

856 CTG AGG CAC GTG GTG CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA  
 286 Leu Arg His Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln

901 GGC GAG TGG AGC GAG TGG AGC CCG GAG GCC ATG GGC ACG CCT TGG  
 301 Gly Glu Trp Ser Glu Trp ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp

946 ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC  
 316 Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro

991 ATG CAG GCA CTT ACT ACT AAT AAA GAC GAT GAT AAT ATT CTC TTC  
 331 Met Gln Ala Leu Thr Thr Asn Lys Asp Asp Asn Ile Leu Phe  
  
 1036 ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC  
 346 Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser  
 +++ +++ +++  
  
 1081 TCA GTA CCA CTG CCC ACA TTC CYG GTT GCT GGA GGG AGC CTG GCC  
 361 Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala  
  
 1126 TTC GGA ACG CTC CTC TGC ATT GCC ATT GTT CTG AGG TTC AAG AAG  
 376 Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile Val Leu Arg Phe Lys Lys  
  
 1171 ACG TGG AAG CTG CGG GCT CTG AAG GAA GGC AAG ACA AGC ATG CAT  
 391 Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly Lys Thr Ser Met His  
  
 1216 CCG CCG TAC TCT TTG GGG CAG CTG GTC CCG GAG AGG CDT CGA CCC  
 406 Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu Arg Pro Arg Pro  
  
 1261 ACC CCA GTG CTT GTT CCT CTC ATC TCC CCA CCG GTG TCC CCC AGC  
 421 Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val Ser Pro Ser  
  
 1306 AGC CTG GGG TCT GAC AAT ACC TCG AGC CAC AAC CGA CCA GAT GCC  
 436 Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro Asp Ala  
 +++ +++ +++  
  
 1351 AGG GAC CCA CGG AGC CCT TAT GAC ATC AGC AAT ACA GAC TAC TTC  
 451 Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr Phe  
  
 1396 TTC CCC AGA TAG  
 466 Phe Pro Arg fin

---

Figura 11. Listas de las secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del IL-6R humano, según Yamasaki *et al* (343).

\* = Cys del dominio C2  
 + + + = sitios potenciales de N-glicosilación  
       = péptido señal  
 número = aminoácidos  
 número = nucleótidos  
 = = = = dominio transmembranal

---

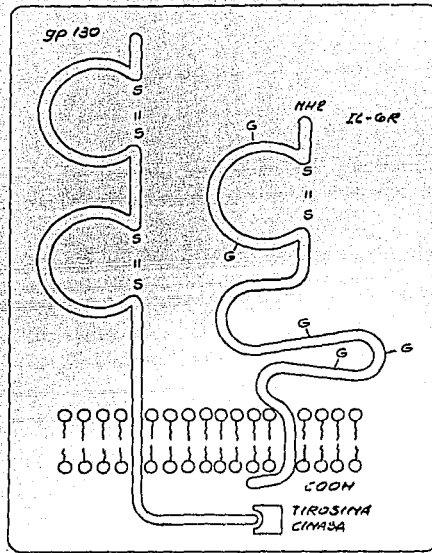


Figura 12. Esquema de la estructura bidimensional que ha sido propuesta para el receptor de la IL-6, tomado y modificado de Kishimoto (132).

La porción extramembranal del receptor para la IL-6 contiene 340 aa. Los primeros 100 aminoácidos forman un dominio parecido al segmento C2 de las cadenas pesadas de las IgG, con un bucle N-terminal de aproximadamente 90 residuos de aa. Es decir, el IL-6R forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Un dominio similar al dominio C2 de las inmunoglobulinas se presenta, igualmente, en los receptores para las citocinas IL-1, PDGF y CSF-1, así como en el receptor para la porción distal de las cadenas pesadas de las IgG [FcγR] y para la α1-B-glucoproteína [α1 B-GP]. Además, la distancia entre las Cys que forman el bucle de la porción extramembranal del receptor es igual a la del dominio C2 (330, 343). El segmento transmembranal de IL-6R contiene 28 residuos de aa y se continúa con un segmento intracitoplásmico constituido por 82 aa, el cual, a diferencia de otros receptores, no se encuentra asociado a la enzima tirosina cinasa (132, 330).

#### 4. 5. 3. Variedades del IL-6R.

Existen dos tipos de receptores para la IL-6, denominados de alta y de baja afinidad, que se encuentran localizados en una gran variedad de células. Los primeros tienen una Kd aproximada de 10 pM y los segundos, una Kd cercana a 10 nM. La afinidad de la IL-6 humana [hIL-6] hacia el hIL-6R es mayor que la de IL-6 murina por el mismo receptor, lo cual indica que la IL-6 humana también es activa en células de ratón, aunque lo contrario no sucede <sup>(330)</sup>.

La unión de la IL-6 con su receptor provoca que este último se asocie a una proteína de membrana de 130 kDa de peso molecular, llamada gp130. El conocimiento de esta unión ha permitido proponer a Kishimoto <sup>(332)</sup> que el receptor de la IL-6 está constituido por dos cadenas polipeptídicas, una ligante (que sería la que hasta ahora hemos denominado IL-6R) y otra no ligante (representada por la gp130).

#### 4. 5. 4. La glucoproteína 130 (gp130).

Hibi *et al* <sup>(95)</sup> informaron en 1990 que la gp130 está compuesta por 918 residuos de aa, en su forma nativa y por 896 aa en su forma madura, con un PM final de 101 kDa. Además, cuenta con 6 unidades de un módulo de fibronectina tipo III, 14 posibles sitios de N-glicosilación y 2 regiones hidrofóbicas. La primera de estas dos últimas está compuesta por los 22 residuos de aa iniciales y se cree que es un péptido señal; la segunda se localiza entre los residuos 620 a 641, contiene 21 residuos de aa y corresponde, probablemente, a la fracción transmembranal.

Una parte de la región extramembranal de la gp130 (que se extiende del residuo 125 al 320) tiene una homología parcial con diversos miembros de una familia de moléculas que actúan como receptores para las hormonas prolactina y del crecimiento, así como también para las interleucinas 2 (cadena  $\beta$  del receptor), 3, 4, 6 y 7 y para los factores formadores de colonias como la Epo, el GM-CSF y el G-CSG, siendo el receptor para este último factor el que más se parece a la gp130. En esta misma región se encuentran cuatro residuos de cisteína, en las posiciones 134, 144, 172 y 182. respectivamente.

**TABLA VII. DIFERENTES RECEPTORES CON LOS QUE LA GP 130 ES PARCIALMENTE HOMÓLOGA (\*).**

---

IL-2R (cadena  $\beta$ ),  
 IL-3R,  
 IL-4R,  
 IL-7R,  
 GM-CSF-R,  
 G-CSF-R,  
 EpoR,  
 PRL-R,  
 GH-R.

---

(\*) Hibi *et al* (95)

---

Por otra parte, la región intracelular de la gp 130 contiene 4 secuencias de aa necesarias para la unión de GTP y una secuencia de 8 aminoácidos que permite su interacción con proteínas cinasas. Adicionalmente, esta región muestra similitud con las porciones intracitoplásmicas del G-CSF-R, EpoR y de la cadena  $\beta$  del IL-2R.

El RNAm de la gp130 está formado por 7 kb y se expresa tanto en las células sensibles a la IL-6, como en la línea celular U266 de mieloma, la línea celular BMNH transformada por el EBV, la línea HepG2 de hepatoma, la línea SK-MG-4 de glioblastoma, las líneas Jurkat y CEM de células T, una línea celular parecida a las células NK, la línea T24 de carcinoma de vejiga, la línea Reh no-T no-B y la línea Daudi de linfoma de Burkitt.

Se cree que la gp130 es la responsable de la formación de sitios de alta afinidad para la IL-6, al estabilizar su unión al IL-6R. Además, parece ser la encargada de transmitir, hacia el interior de la célula, la señal generada por la unión de ésta interleucina a su receptor (95, 132, 330). La siguiente Tabla presenta varias de las características que poseen el IL-6R y la gp130, según Hibi *et al* (95) y Kishimoto (132).

**TABLA VIII. ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL RECEPTOR DE LA IL-6 Y LA GP130**

| CARACTERISTICA                | IL - 6R   | GP130           |
|-------------------------------|---|-----------------|
| Peso molecular aparente (kDa) | 80  | 130             |
| Número de aminoácidos         |   |                 |
| total                         | 468   | 918             |
| proteína madura               | 449   | 896             |
| Estructura genómica           | desconocida   |                 |
| Localización                  | cromosoma 1   |                 |
| Sitios de N-glucosilación     | 6   | 14              |
| Segmento transmembranal       | único   | único           |
| Porción intracitoplásmica     | 82 aa   | 277 aa          |
| Homología de secuencia        | superfamilia Ig<br>sin dominio para la<br>tirosina cinasa | (ver tabla VII) |

#### 4. 5. 5. Células que expresan el IL-6R.

Los receptores para la IL-6 se expresan en varios tipos de células, tales como linfocitos B activados, linfocitos T en reposo, macrófagos, líneas de células B linfoblastoides, líneas de células de mieloma, líneas de hepatoma y líneas de monocitos. También, el receptor ha sido encontrado en varias líneas celulares de origen epitelial, neural, hematopoyético y fibroblástico <sup>(186)</sup>.

Las células blanco de la IL-6 poseen, por lo general, entre 100-1,000 receptores/célula. Las células de mieloma múltiple humano y las líneas celulares inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr son las que poseen el mayor número de receptores de alta afinidad (10,000/célula) pero, el tipo celular que expresa el mayor número de receptores sobre la superficie de su membrana es la línea celular U266 de mieloma, con 10,000-20,000 IL-6R/célula <sup>(132)</sup>. En contraste, las células T, las células B y los macrófagos normales muestran solamente unos pocos cientos de receptores <sup>(330)</sup>. La expresión del IL-6R en los linfocitos T se ve disminuida durante su activación,



mientras que en los linfocitos B se presenta únicamente en las etapas finales de su maduración <sup>(349)</sup>.

El grupo de Fujihashi <sup>(70)</sup> ha observado que los linfocitos B sIgA<sup>(+)</sup> obtenidos de la submucosa del apéndice humano son, hasta el momento, las únicas células del tejido humano linfoide en las que ha sido demostrada la expresión de receptores para la IL-6 de manera constitutiva. En ellas, el número de receptores para IL-6 es mucho mayor que en las células B de sangre periférica estimuladas con PWM. En las subpoblaciones de células T CD4 <sup>(+)</sup> y CD8 <sup>(+)</sup>, el número de receptores para la IL-6 es parecido y no cambia después de la estimulación con PHA.

Los hibridomas y los plasmocitomas también poseen una cantidad aproximadamente igual de receptores para IL-6 sólo que, en este caso, se trata de receptores de alta afinidad. Las líneas celulares de hepatoma poseen IL-6R de baja afinidad, mientras que las líneas celulares de mieloma poseen receptores de alta y baja afinidad para IL-6 <sup>(260)</sup>.

**TABLA IX. EXPRESIÓN DEL IL-6R EN DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS <sup>(\*)</sup>**

| CÉLULAS                                      | RECEPTORES/CÉLULA |
|--|-------------------|
| Linfocitos B activados                       | ~ 500             |
| Linfocitos B en reposo                       | no detectable     |
| Linfocitos T en reposo                       | ~ 300             |
| Líneas de linfocitos B transformadas por EBV | 10,000 - 20,000   |
| Líneas de linfoma de Burkitt                 | no detectable     |
| Cél. y líneas cel. de mieloma                | 100 - 20,000      |
| Líneas cel. de hepatoma                      | 2,000 - 3,000     |
| Líneas cel. de leucemia mieloide             | 2,000 - ~ 3,000   |
| Feocromocitoma de rata (PC12)                | ~ 1,000           |
| Líneas cel. de mieloma U266                  | 10,000 - 20,000   |
| Líneas cel. de mieloma H929                  | 16,500            |

(\*) Kishimoto <sup>(132)</sup>

cél. = células

Líneas cel. = líneas celulares

#### 4. 5. 6. Control de la expresión del IL-6R.

En los linfocitos B humanos de sangre periférica o de las amígdalas, la síntesis del IL-6R puede inducirse mediante la estimulación con mitógenos o con antígenos (70). De igual forma, en los cultivos de blastos de células B, la expresión del receptor para la IL-6 puede ser inducido por el mitógeno fitolaca americana [PWM]. Por otra parte, en ciertas líneas celulares, la expresión de los receptores para la IL-6 se incrementa al tratarlas con dexametasona (286).

Recientemente, en 1991, Sanceau *et al* (245) han encontrado que, en las células THP-1, el IFN $\gamma$  aumenta la formación de RNAm para éste receptor, mientras que la combinación de IFN $\gamma$  y TNF disminuye los niveles del RNAm para el IL-6R.

## 5. Regulación de la producción de IL-6

---

### 5. 1. Los inductores.

En la mayoría de las células normales la IL-6 no se sintetiza de manera constitutiva, es decir sin necesidad de estímulos. Existen diversos mecanismos positivos y negativos que controlan su producción, mediante diversas señales intracelulares. La síntesis de la IL-6 puede ser estimulada rápidamente por una gran cantidad de sustancias que son conocidas como inductores. Entre éstos, los mejor conocidos son algunos virus de RNA o DNA, los LPS o endotoxinas de las bacterias Gram-negativas, varias citocinas como las IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , el TNF $\alpha$  solo o en combinación con IFN $\gamma$ , la IL-3, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos [GM-CSF] y el factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF] (332, 310, 330).

La producción de la IL-6 también puede ser inducida por diversos agonistas de segundos mensajeros intracelulares que activan las proteínas cinasas A o C, que incrementan la síntesis de AMPc, o que estimulan las vías de transducción de señales que son activadas al aumentar el flujo intracitoplasmático de Ca<sup>2+</sup> (96, 137, 138, 230, 257, 334, 349).

Otros inductores, utilizados frecuentemente para estimular la síntesis de la IL-6 en cultivos de células, son el forbol miristato acetato [PMA], los virus de pseudotrabaja y Sendai, el suero, el factor de crecimiento epidérmico [EGF], el nucleótido cíclico sintético Br-AMPc, el forskolin, el diacilglicerol, el ionóforo de Calcio A23187 y el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato [TPA] (335, 349).

Todos los inductores mencionados, ya sea solos o combinados, ponen en marcha diversos procesos bioquímicos que conducen a la activación del núcleo de la célula y, concretamente, a la expresión del gene de la IL-6.

Algunos estudios han revelado que varias citocinas, como la IL-1, el IFN $\gamma$ , el TNF y el PDGF, estimulan la producción de IL-6 en fibroblastos diploides (41, 50, 86, 127, 128, 137, 138, 264, 268, 317, 334). Por otro lado, los grupos de investigadores de Miyaura *et al* (188) y Shabo *et al* (261) han publicado resultados en favor de que la IL-6 es capaz de autoestimular su síntesis.

Se ha observado que los pacientes cancerosos que reciben IL-2 o TNF como tratamiento incrementan significativamente la producción de IL-6 y la concentración en el suero de esta citocina (122). En los cultivos de monocitos y de células de la médula ósea, los estimuladores del crecimiento celular, como el GM-CSF, también resultan buenos activadores de la síntesis de IL-6 (235).

Se cree que cada inductor de la IL-6 generalmente actúa utilizando mecanismos distintos, según el tipo de célula sobre la que ejerce su acción. En los cultivos de fibroblastos que sí pueden sintetizar IL-6 de manera constitutiva, se ha encontrado que la adición de cicloheximida aumenta más de 2 a 3 veces la expresión del RNAm para la IL-6 y la actividad de las enzimas transcripcionales. En esta misma línea de células, el TNF $\alpha$  incrementa 5 a 15 veces las mismas actividades enzimáticas (260, 334), mientras que en los cultivos de células THP-1, la misma citocina no produce cambios (245).

El efecto inductor del TNF y de la IL-1 en la síntesis de IL-6 por los fibroblastos ha sido determinado por la aparición rápida de RNAm para esta última citocina (334). Por otra parte, la expresión constitutiva de IL-6 se ha observado en células de mixoma cardíaco, en células de cáncer cervical, en células de carcinoma de vejiga y en mielomas humanos (97, 129).

#### **TABLA X. PRINCIPALES INDUCTORES DE IL-6**

- 
1. LIPOPOLISACARIDOS BACTERIANOS,
  2. INFECCIONES VIRALES,
  3. TNF $\alpha$ ,
  4. IL-1 e IL-3,
  5. TNF $\alpha$  o IL-1, EN COMBINACION CON IFN $\gamma$ ,
  6. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS,
  7. FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS,
  8. SUERO,
  9. POLI (I), POLI (C),
  10. CICLOHEXIMIDA

En 1987, Sehgal *et al* <sup>(257)</sup>, encontraron que cuando el ionóforo de calcio A23187 y los diacilgliceroles sintéticos se añaden al medio de cultivo de la línea FS-4 de fibroblastos humanos, estas células incrementan la transcripción del RNAm para la IL-6. El RNAm para la IL-6 también se puede expresar constitutivamente en otras células anormales, como lo son varias líneas de células malignizadas, entre las cuales se pueden mencionar la línea celular T24 de carcinoma de vejiga, la línea TCL-Na1 obtenida de células T transformadas por el HTLV-1 y una línea celular derivada del amnios <sup>(97)</sup>. La IL-1 $\beta$  induce la síntesis de RNAm para la IL-6 cuando estimula las líneas celulares U-373 de astrocitoma y la línea SK-MG-4 de glioblastoma <sup>(346)</sup>. El TNF también puede inducir la síntesis de este RNA, *in vitro*, cuando los estudios se llevan a cabo sobre líneas celulares tumorales <sup>(50)</sup>.

En los cultivos de fibroblastos, el inductor más potente de la síntesis de la IL-6 es la IL-1. En cambio, la misma IL-1 es un agente inductor mucho menos potente cuando se añade a cultivos de células de la médula ósea, las cuales responden aumentando mucho más la producción de IL-6 al estimularlas con IL-3 o con el GM-CSF <sup>(330)</sup>. Los fibroblastos y los monocitos también incrementan su producción de IL-6 cuando se les cultiva en presencia de LPS <sup>(91, 125)</sup>. Otro inductor del BSF-2/IL-6 en fibroblastos y en células mononucleares de sangre periférica es el TGF $\beta$  <sup>(57, 309)</sup>.

En las células T, la producción de IL-6 se puede inducir con mitógenos o por estímulos antigénicos, siempre y cuando exista la presencia y el contacto directo con los macrófagos <sup>(112)</sup>.

En otros experimentos se ha demostrado que los estrógenos también participan en la inducción de la IL-6, particularmente cuando estimulan las células del endometrio humano <sup>(289)</sup>. Por otra parte, la misma IL-6 puede producirse de manera constitutiva en las células del trofoblasto humano, durante el embarazo <sup>(208)</sup>.

Diversos virus también son responsables de inducir la producción de IL-6 en fibroblastos, monocitos o en células del sistema nervioso central <sup>(320)</sup>. Así por ejemplo, el HIV induce la síntesis de IL-6 en los monocitos <sup>(28)</sup>.

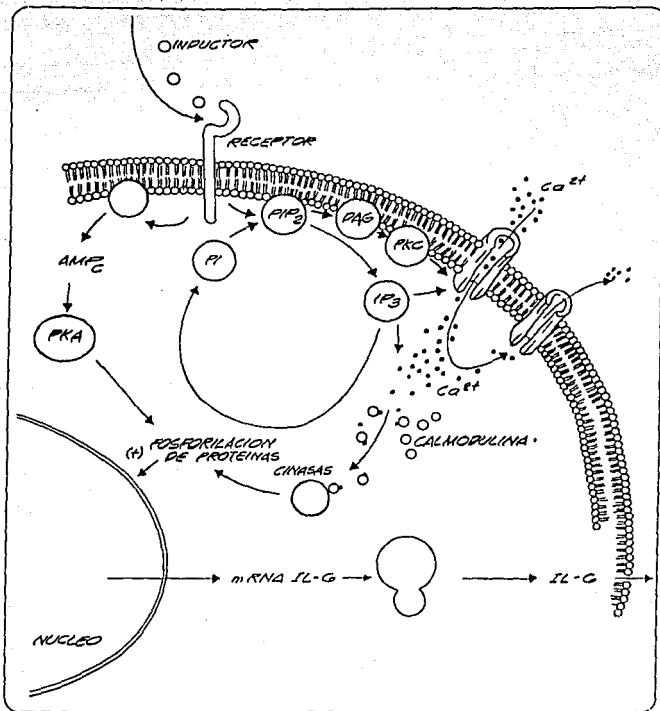


Figura 13. Algunas de las principales señales intracelulares que se activan cuando las células son estimuladas por los inductores de la IL-6.

Por otra parte, la expresión del gene de la IL-6 puede estar controlada negativamente por varias sustancias. Entre éstas se encuentran los glucocorticoides. Su actividad inhibitoria ha sido demostrada mediante diversos experimentos realizados con muestras de varios tejidos y células. Se han publicado resultados en favor de que la dexametasona [DEX] es un potente inhibidor de la inducción de IL-6 en fibroblastos estimulados con IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y LPS (90, 138) y en células de la pituitaria anterior de ratas (33). Otro inhibidor de la producción y las funciones de esta citocina es el 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (197).

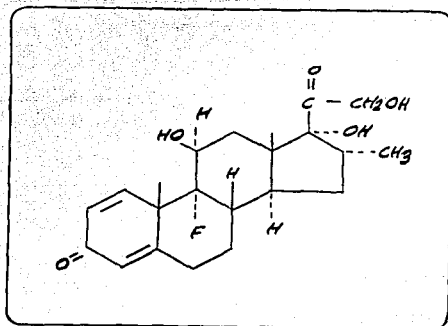


Figura 14. Estructura química de la dexametasona.

## 5.2. Control de la producción de IL-6.

Durante los últimos 6 años se ha observado que, por lo general, para la amplificación de las respuestas inmunológicas e inflamatorias se requiere la colaboración de varias citocinas <sup>(221)</sup>. La confirmación de esta actividad biológica ha propiciado diferentes investigaciones con el objetivo de encontrar sustancias inocuas que resulten buenas inductoras de la síntesis de algunas citocinas, ya que, al aumentar la concentración de éstas en la sangre o los tejidos, se podrían obtener efectos terapéuticos en varias enfermedades. Así por ejemplo, la combinación del IFN $\gamma$  con el TNF $\alpha$  o con el muramil dipéptido [MDP] ha resultado ser un potente inductor de IL-6 en monocitos y en líneas celulares derivadas de ellos <sup>(244)</sup>.

Algunos de estos experimentos han revelado que la tolerancia a las endotoxinas conlleva una disminución en la síntesis de algunas citocinas. Así por ejemplo, en el caso de varias cepas de ratones tolerantes a los LPS, ya sea en una forma inducida o genéticamente determinada, se ha encontrado que los macrófagos de estos animales tienen disminuida su producción de TNF $\alpha$  e IL-1.

Recientemente, en 1991, Mengozzi y colaboradores <sup>(182)</sup> observaron otro aspecto interesante en la inducción de la IL-6. Sus experimentos, realizados *in vivo*, permitieron demostrar que la síntesis de IL-6 se controla de una manera distinta a la síntesis del

TNF $\alpha$ . También encontraron que la tolerancia de los ratones hacia los LPS, ya sea inducida o adquirida genéticamente, puede revertirse mediante un pretratamiento con forbol miristato acetato [PMA] o con IFN $\gamma$ . El PMA es capaz de restaurar únicamente la síntesis de IL-6, mientras que la administración del IFN $\gamma$  mejora solamente un poco la producción de IL-6, pero mucho más la síntesis del TNF $\alpha$ , en cualquier tipo de ratones tolerantes a los LPS.

Durante ese mismo año, el grupo de investigadores dirigidos por Sanceau <sup>(245)</sup>, estudió el mecanismo por el cual la adición simultánea de IFN $\gamma$  y de TNF $\alpha$  a cultivos de células THP-1 promueve el aumento en la expresión de los genes de la IL-6 y del IL-6R, así como un incremento en la secreción de las moléculas codificadas por ambos genes. Ellos encontraron que el conjunto de las dos citocinas mencionadas activa considerablemente la expresión del gene de la IL-6, induciendo rápidamente (en 6 horas) la aparición de grandes cantidades del RNAm para la IL-6 y la secreción abundante de la interleucina.

Sin embargo, los mismos autores <sup>(245)</sup> también observaron que este fenómeno no se repite constantemente en todas las células que ellos estimularon. La preincubación de los monocitos de la línea THP-1 con IFN $\gamma$  solamente estimula significativamente la formación del RNAm para el IL-6R, aumentando en un 50% la expresión de este receptor 6 horas después del tratamiento con la mezcla de TNF $\alpha$  más IFN $\gamma$ . En cambio, la combinación de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  sin la preincubación con IFN $\gamma$ , más bien disminuye estos eventos, mientras que, en la misma línea celular mencionada, los LPS reducen la expresión del IL-6R.

Después de analizar todos estos resultados, Sanceau *et al* <sup>(245)</sup> han sugerido, de acuerdo con Bauer *et al* <sup>(16)</sup> que, probablemente, la inhibición de la síntesis del IL-6R se debe a una supresión específica mediada por su ligando. Sanceau *et al* <sup>(245)</sup> proponen que las dos primeras citocinas estimulan la producción y la secreción de la tercera porque el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  activan o promueven la expresión transitoria de sustancias diferentes, no identificadas, cuya participación simultánea se requiere para la transcripción del gene de la IL-6, tal y como se ha encontrado en genes IFN-sensibles.

Además, Sanceau y su grupo encontraron que la cicloheximida inhibe la traducción del RNAm para la IL-6 en las células THP-1. De acuerdo a estas observaciones, ellos propusieron que la superinducción del RNAm de la IL-6 por el IFN $\gamma$  se encuentra



asociada a la síntesis *de novo* de otras proteínas (como HLA) que también son inducidas por el IFN $\gamma$ , las cuales deben estar presentes para colaborar con la IL-6 que se produce por la estimulación simultánea con el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ . Adicionalmente, ellos señalan que la inducción del gene de la IL-6 por el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ , así como la superinducción de la IL-6 por la primera citocina, son eventos que se encuentran regulados por mecanismos distintos.

Estos mismos autores <sup>(245)</sup> también indican que sus resultados apoyan la idea de que, en condiciones fisiológicas, probablemente el IFN $\gamma$  puede regular positivamente la expresión del IL-6R en los monocitos, mientras que, en los procesos inflamatorios, el mismo IFN $\gamma$  en combinación con el TNF $\alpha$ , más bien debe provocar una disminución en la expresión de los IL-6R, lo cual puede estar mediado por el ligando. Sanceau y sus colaboradores <sup>(245)</sup> finalizan la proposición de sus hipótesis afirmando que, posiblemente, el IFN $\gamma$  es un elemento fisiológico importante que participa en la homeostasis de las actividades de los monocitos. Sin embargo, hasta el momento, se desconocen los elementos que están involucrados en la inducción de la expresión del gene de la IL-6 cuando ésta es mediada por IFN $\gamma$ .

### 5. 3. Los mensajes intracelulares que transmiten los inductores.

El RNAm para la IL-6 aumenta significativamente en el citoplasma de células cultivadas cuando éstas son estimuladas con agentes que activan la proteína cinasa C o que elevan la concentración intracitoplasmática de AMPc. Tal es el caso de los ésteres de forbol, los diacilglicérols y los ionóforos de calcio <sup>(350)</sup>.

En 1988, Zhang y colaboradores <sup>(349)</sup> observaron que las sustancias que incrementan el AMPc intracelular son las que inducen más rápidamente la síntesis de la IL-6. Por esta razón estos autores sugirieron que la inducción de la síntesis de IL-6, por el TNF $\alpha$  y por la IL-1, podría depender de la activación, de la vía del AMPc. Los mismos autores también mostraron que la asociación AMPc/IL-6 depende, parcialmente, de que los dos agentes inductores mencionados activen la proteína cinasa C, cuya actividad enzimática influye sobre la concentración citoplasmática del AMPc. Las dosis de TNF $\alpha$  e IL-1 necesarias para incrementar los niveles del AMPc son las mismas que hacen falta para estimular la producción de IL-6.

Estos resultados han conducido a proponer la existencia de una segunda señal intracelular para la producción de IL-6 en los fibroblastos estimulados con IL-1. Esta segunda señal sería dependiente de la concentración intracelular de AMPc e independiente de la proteína cinasa C. La proposición anterior implica que, probablemente, la producción de IL-6 puede estar relacionada con la presencia en el DNA de varias secuencias de nucleótidos [MRE] que funcionan como elementos aumentadores de la transcripción de su gene. Estas secuencias han sido encontradas tanto en el genoma humano como en el murino <sup>(231)</sup>.

En los linfocitos de las amígdalas y en fibroblastos humanos, se ha encontrado que los compuestos que activan la proteína cinasa C también son estimulantes de la expresión del gene de la IL-6.

#### **5.4. Mecanismos de transducción de las señales que se generan cuando la IL-6 se une a su receptor.**

Hasta la fecha es muy poco lo que se conoce acerca de los mecanismos de señalización intracitoplásmica que generan las citocinas cuando se unen a su receptor de membrana. En el caso de la IL-6, se sabe que el IL-6R carece de un dominio asociado a la tirosina-cinasa y que la gp 130 es la proteína encargada de transmitir la señal que genera la unión de la IL-6 a su correspondiente receptor <sup>(330)</sup>.

Hibi *et al* <sup>(95)</sup> han sugerido, en 1990, que las actividades pleiotrópicas de la IL-6 se pueden explicar por la presencia de varias moléculas diferentes que, en la ruta de señales generadas por la interacción de IL-6 con su receptor, estarían localizadas abajo de la gp130. Estas moléculas podrían variar para cada tipo de células sobre las que la interleucina estaría actuando.

Recientemente, en 1991, el equipo de investigadores de Fukunaga <sup>(69)</sup> ha tratado de identificar a los elementos intracelulares que participan en la transducción de la señal que genera la IL-6 al unirse a su correspondiente receptor. Sus observaciones, *in vitro*, los han llevado a comprobar que, en las células del mesangio de rata, la IL-6 provoca un incremento rápido y transitorio del inositol 1,4,5-trifosfato [Ins 1,4,5-P<sub>3</sub>] y un aumento en la concentración de calcio intracelular, lo cual promueve la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> [PGE<sub>2</sub>], todo esto dependiendo de la dosis de la IL-6 empleada.

En el caso del Ins 1,4,5-P<sub>3</sub>, su aumento se registró a los 10 segundos y regresó a sus valores basales 20 segundos más tarde. La concentración del calcio intracelular se incrementó a los 15 segundos y desde ese momento comenzó a disminuir rápidamente hasta que alcanzó un valor que apenas era ligeramente mayor al de su nivel basal. En ambos casos el efecto se observó después de la adición de la IL-6 a los cultivos de células arriba mencionados.

Fukunaga *et al* <sup>(69)</sup> encontraron que la IL-6 promueve la ruptura del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato [PIP<sub>2</sub>], liberando diacilglicerol [DAG] e inositol-1,4,5-trifosfato [Ins 1,4,5-P<sub>3</sub>]. Esta última molécula es la que, a su vez, activa el intercambio de Ca<sup>2+</sup>, con diversos efectos biológicos. Además, los mismos autores sugieren que, como la IL-6 origina la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> [PGE<sub>2</sub>] y el incremento simultáneo del Ins 1,4,5-P<sub>3</sub>, la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> en las células del mesangio de rata debe ser estimulada por algún mecanismo acoplado a la vía de señalización del fosfoinosítido [PI].

En otro estudio, publicado en ese mismo año <sup>(161)</sup>, se informó que, durante la inducción de la diferenciación de las células de leucemia mieloide, tanto la IL-6 como el LIF activan las mismas respuestas inmediatas, entre las que se encuentra la fosforilación de la tirosina.

## 6. Principales actividades biológicas de la IL-6

---

### 6. 1. Estimulación del crecimiento de hibridomas y plasmocitomas.

Varios años después de que Potter y Boyce <sup>(216)</sup> lograron la inducción de plasmocitomas en ratones Balb/c inyectados intraperitonealmente con aceite mineral, se pudo comprobar que los tumores se generaban exclusivamente en los tejidos granulomatosos que producían una gran cantidad de un factor soluble que fue denominado factor de crecimiento de plasmocitomas [PCT-GF]. Posteriormente, tres años después de que Köhler y Milstein <sup>(139)</sup> desarrollaran la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales, se pudo establecer que el crecimiento de los hibridomas viables también dependía de la existencia de varios factores capaces de estimular su multiplicación.

Los primeros experimentos revelaron que el crecimiento de los hibridomas se estimulaba cuando al medio de cultivo se añadían algunas células, tales como los macrófagos peritoneales, las células del timo y del bazo, los fibroblastos o medios de cultivo condicionados con ellas <sup>(60, 284)</sup>. En los medios condicionados activos se encontró la sustancia soluble responsable de promover la proliferación celular de los hibridomas recién formados. Esta sustancia fue denominada factor de crecimiento de hibridomas [HGF] <sup>(1, 20, 326)</sup>.

La caracterización bioquímica del HGF murino por Nordan y Potter <sup>(209)</sup>, en 1986, reveló que la molécula era similar a otro factor estimulante, ya mencionado en el párrafo anterior, que promovía el crecimiento de tumores murinos y que había sido llamado PCT-GF. Posteriormente se llegó a conocer que los factores estimulantes del crecimiento de plasmocitomas e hibridomas [PCT-GF y HGF], humanos y murinos, eran similares al IFN $\beta_2$ , al factor-2 estimulante de células B [BSF-2] y a la IL-6 <sup>(210)</sup>. Poco

después, se reconoció la igualdad de todas estas moléculas y se les asignó el nombre genérico de IL-6 <sup>(227)</sup>.

Actualmente, numerosos estudios realizados *in vitro* han confirmado que IL-6 es un buen estimulante del crecimiento de los hibridomas y de los plasmocitomas derivados de linfocitos B humanos y murinos <sup>(332)</sup>. La adición de esta interleucina a los cultivos de células tumorales ha contribuido a mejorar considerablemente la producción de anticuerpos monoclonales <sup>(209, 226, 228)</sup>. Otras células cuyo crecimiento también puede ser estimulado de la misma manera por la IL-6 son las líneas de linfocitos B que han sido transformados por el virus de Epstein-Barr, especialmente a bajas densidades celulares <sup>(305)</sup>. Este último efecto será descrito con más detalles más adelante, en el inciso correspondiente a la actividad que tiene la IL-6 sobre las células B.

Se han encontrado plasmocitomas cuyo crecimiento resulta completamente dependiente de IL-6. En estas células, cuando se interrumpe la adición de la citocina se produce una detención del crecimiento en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular <sup>(204)</sup>.

Durante 1987, Bazin y Lemieux <sup>(20)</sup> ya habían aportado pruebas que apoyaban la capacidad estimuladora de la IL-6 sobre el crecimiento de los hibridomas murinos. La continuación de sus estudios <sup>(21)</sup> demostró que, además, el mismo factor estimulaba la síntesis de anticuerpos monoclonales. En los hibridomas obtenidos por fusión de células de mieloma murino con linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con eritrocitos humanos, se pudo observar que el medio de cultivo condicionado, conteniendo el HGF, incrementaba más la producción de anticuerpos monoclonales que el número total de células híbridas.

Las líneas de hibridomas 7TD1 y B9, derivadas de linfocitos B y dependientes de la IL-6, necesitan aproximadamente 1 pg/ml de esta citocina para alcanzar la mitad de su máximo crecimiento. Esta cantidad es 2 a 3 veces menor que el valor de la Kd calculado al estudiar la unión de la IL-6 a sus receptores de alta afinidad. Por otra parte, para lograr esa misma tasa de crecimiento, los plasmocitomas necesitan 100 veces más esa cantidad, mientras que los linfocitos B normales apenas requieren 2 ng/ml de IL-6 <sup>(330)</sup>.

Algunos autores han encontrado que la IL-6 presenta varias diferencias antigénicas según las especies animales estudiadas. Así por ejemplo, el factor de crecimiento de hibridomas, de origen felino, también posee actividad de IL-6 aunque no resulta

completamente igual a IL-6 humana, desde un punto de vista antigénico. El suero de conejo anti BSF-2/IL-6 humano no neutraliza la proliferación de la clona B3B1 de hibridoma de ratón-rata. Todo esto significa que, al menos en el humano, el ratón y el gato existen moléculas que, aunque son antigénicamente distintas, tienen en común la propiedad de promover el crecimiento de los hibridomas (213).

Sin embargo, la actividad estimulante del crecimiento celular que tiene IL-6 no se limita a los plasmocitomas e hibridomas de células tumorales. Algunos experimentos realizados con mielomas humanos han demostrado que estas células malignizadas también aumentan su tasa de crecimiento, *in vitro*, cuando se les añade IL-6 al medio de cultivo; en cambio, las mismas células reducen su tasa de multiplicaciones cuando se les adicionan anticuerpos anti IL-6 (129,135). No obstante, se debe señalar que, para el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares de mielomas humanos que son dependientes de la IL-6, también se requiere, además de la interleucina, que el medio de cultivo contenga macrófagos o el factor GM-CSF (305).

Algunos autores han propuesto que la actividad de la IL-6, de estimular *in vitro* el crecimiento de los hibridomas, los plasmocitomas y los mielomas, puede tener alguna relación con la proliferación de tumores malignos *in vivo*. Van Snick (330) ha sugerido que, posiblemente, la IL-6 actúa como un factor estimulante del crecimiento de algunos tumores *in vivo*. Esta opinión se apoya en la observación de que, en el caso de los ratones con plasmocitomas inducidos experimentalmente, sus células tumorales requieren de IL-6 para desarrollarse, tanto *in vivo* como *in vitro*. El crecimiento de las neoplasias que derivan de los linfocitos B puede ser otro ejemplo en favor del punto de vista anterior, ya que, en los estadios medio y tardío de la diferenciación de estas células malignizadas, se ha encontrado un aumento en la formación del RNAm para la IL-6 (65, 129). Asimismo, se ha podido observar que algunos pacientes con mieloma fulminante presentan incrementos importantes en los niveles de IL-6 en la médula ósea, además de una correlación entre dichos niveles y la actividad de la enfermedad. Sin embargo, es conveniente señalar que el aumento en la secreción de IL-6 sólo se observa en un número reducido de estos pacientes (15, 135).

Para Klein y colaboradores (135), la estimulación del crecimiento de los mielomas por la IL-6 se lleva a cabo en una forma paracrina. Este punto de vista se fundamenta en que, como ellos lo comprobaron, las células del estroma de la médula ósea son las que producen la cantidad mayor de la interleucina. Sin embargo, Levy *et al* (155) han

realizado estudios, *in vitro*, cuyos resultados apoyan la idea de que IL-6 también puede estimular el crecimiento de los mielomas en una forma autócrina. Sus resultados demuestran que dos líneas celulares de mieloma múltiple humano, U266 y RPMI8226, secretan pequeñas cantidades de IL-6. En estos cultivos, la adición de anticuerpos anti IL-6 no modifica la proliferación de las células tumorales. Estos resultados, en favor de la producción autócrina de IL-6 por los mielomas, coinciden con los que habían sido informados previamente por Kawano *et al* (129). Adicionalmente, Levy *et al* (155) encontraron que la adición de oligodesoxinucleótidos antisentido y sin sentido, para la IL-6, inhiben significativamente (80-95%) la proliferación de las células U266 y RPMI8226. Como no son definitivos los resultados anteriores, respecto a la acción de la IL-6 como promotora del crecimiento de los mielomas, los mismos autores (155) han propuesto una hipótesis según la cual las células madres del mieloma (que originan colonias malignas *in vitro*), pueden llenar los sitios donde se encuentran células plasmáticas y, después, proliferar bajo el estímulo de la IL-6.

## 6. 2. Estimulación de la diferenciación de las células B.

La IL-6 es una linfoquina, producida por los linfocitos T, que posee la capacidad de inducir la diferenciación terminal de los linfocitos B hacia células plasmáticas (23,199). Además, la IL-6 incrementa la producción de IgM, IgA e IgG en las células mononucleares periféricas [PBL] cuando éstas son estimuladas, *in vitro*, con el mitógeno fitolaca americana [PWM] (233). Sin embargo, esta interleucina no afecta el crecimiento de las células B activadas con mitógenos, puesto que no modifica sus tasas de proliferación (98, 198).

Para que la IL-6 pueda ejercer sus actividades biológicas se requiere que sus células blanco expresen los receptores específicos de la interleucina. Así por ejemplo, los linfocitos B de las amígdalas y de sangre periférica son células blanco cuya proliferación puede ser estimulada por la IL-6, solamente si han sido previamente activados. Los receptores para la IL-6 sólo se expresan después de la activación de los linfocitos B. Por esta razón, los linfocitos B en reposo, que no expresan receptores para IL-6, no son sensibles a esta interleucina (291).

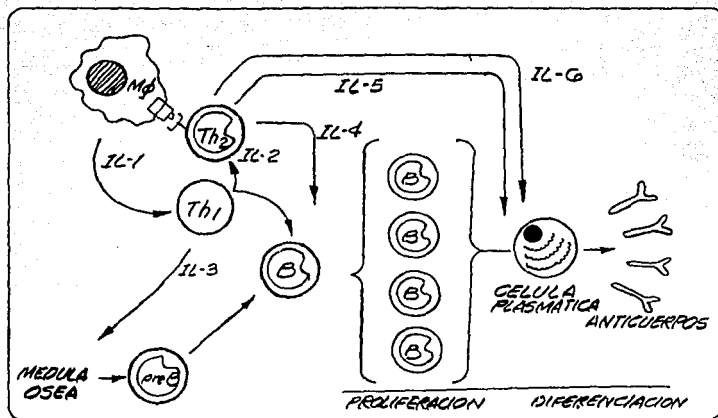


Figura 15. El esquema relaciona la actividad de IL-6 sobre la diferenciación de los linfocitos B con las actividades que tienen otras interleucinas sobre la síntesis de anticuerpos.

La IL-6 ejerce un efecto estimulador, casi exclusivo, sobre la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas [Igs]. Esto ha sido observado en los linfocitos B humanos que han sido estimulados con la cepa Cowan I de *Staphylococcus aureus* [SAC] y en los linfocitos B inmortalizados después de su infección con el EBV. En estas últimas células se ha observado que, al añadir la IL-6, se incrementan la síntesis de DNA y la inmortalización de la línea celular. Pero en ninguna de estas dos clases de linfocitos B la IL-6 puede promover su proliferación (304, 305, 307). La actividad estimulante de la IL-6 sobre la producción de inmunoglobulinas también ha sido observada en los cultivos de linfocitos obtenidos de las Placas de Peyer de ratones, en donde las células B mIgA<sup>(+)</sup> incrementan específicamente su producción de IgA después de añadir IL-6 al medio de cultivo (22).

El efecto estimulante de esta interleucina sobre la síntesis de los anticuerpos puede ser amplificado por la acción sinérgica que existe entre la IL-6 y la IL-1, como ya ha sido observado en los linfocitos B del bazo de ratones, después de su estimulación con sulfato de dextrán. Con ambas interleucinas se logra que la síntesis de IgM se incremente unas 50 veces, acompañada de una pequeña estimulación de la proliferación de dichos



linfocitos. Este sinergismo también se presenta en células B humanas, estimuladas con IL-2 y dexametasona (22, 59, 333). La concentración de IL-6 que se requiere para llevar a cabo esta actividad estimulante de la producción de inmunoglobulinas es aproximadamente 2,000 veces mayor de la que necesitan los hibridomas y los plasmocitomas para su crecimiento (330). Otros experimentos realizados *in vivo* han confirmado que IL-6 es uno de los factores fundamentales para la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Se ha sugerido que la IL-6 es necesaria para la respuesta inmunitaria humoral de los ratones ya que, *in vivo*, esta interleucina promueve un aumento secundario en la respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (294).

Sin embargo, en 1990, Splawski y su grupo de investigadores (278) encontraron que, por sí sola, la IL-6 no mantiene la formación de células secretoras de inmunoglobulinas [ISC] ni puede inducir la secreción de anticuerpos en células B no estimuladas o estimuladas con *Staphylococcus aureus* [SA], tal y como lo había informado en 1988 el grupo de Muraguchi (199). Los estudios de Splawski *et al* (278) se realizaron sobre células B humanas de sangre periférica. Los resultados obtenidos han servido para que los autores mencionados propongan que, en el caso de los linfocitos B, la IL-2 es la principal citocina relacionada con la formación de células productoras de anticuerpos [ISC] y con la secreción de los mismos. Los mismos autores también afirman que IL-2 se requiere para que las células B sean sensibles a la IL-6. Ellos sostienen que la IL-6 más bien ejerce un efecto coestimulador, junto con la IL-2, durante la secreción de todos los isotipos de inmunoglobulinas, cuando los linfocitos B son estimulados con SA e IL-2, ya que ambas interleucinas son necesarias para esta subpoblación de linfocitos. Asimismo, ellos demuestran que la preactivación de dichas células, con SA e IL-2, incrementa exclusivamente la producción de inmunoglobulinas, sin modificar la tasa de proliferación de los linfocitos B. De modo que, de acuerdo a esos resultados, la IL-6 parece incrementar la formación de células plasmáticas solamente cuando está apoyada por la IL-2. Por otra parte, estos autores sostienen que IL-6 sólo ejerce un efecto notable sobre la producción de ISC cuando se adiciona al cultivo dentro de las primeras 24 horas.

Los resultados anteriores son muy interesantes, pero no definitivos. Así por ejemplo, otros autores (123) han comprobado que la IL-6, por sí sola, puede aumentar la inducción de la diferenciación de los linfocitos B que han sido estimulados con el mitógeno PWM. Es posible que este resultado sea dependiente de las células TH<sub>1</sub>, las cuales producen IL-2 cuando son estimuladas por IL-6. Sin embargo, los resultados de otras investigaciones (98) revelan que los linfocitos B que han sido transformados por el

EBV no requieren de la IL-2 para incrementar su secreción de inmunoglobulinas cuando se les adiciona IL-6. Otras discrepancias entre los resultados de Splawsky *et al* (278) y los que habían sido obtenidos previamente por otros autores son las pruebas en favor de que la IL-4 y la IL-6 no mantienen la diferenciación de los linfocitos B a ISC. Ellos (278) tampoco reconocen el efecto sinérgico, entre la IL-1 y la IL-6, para el mantenimiento de la formación de ISC. Además, encuentran que ambas interleucinas sólo producen una mínima secreción de Ig, en células B estimuladas con SA. No obstante, sí observan un pequeño incremento de ambos efectos, cuando combinan la actividad de las dos citocinas, en células previamente estimuladas con IL-2 y SA.

En los últimos años se han publicado varios resultados en favor de que existen otras citocinas que participan en la amplificación de la producción de Ig por linfocitos B que han sido estimulados inicialmente con la IL-2. Entre las más importantes se pueden mencionar la IL-4, el IFN $\gamma$ , la IL-1 y el TNF $\alpha$ .

Actualmente se acepta que la IL-6 ejerce un efecto tardío en la secreción de inmunoglobulinas; aunque se puede considerar que, asociada a la IL-2, también tiene un efecto temprano sobre la formación de ISC. Emilie *et al* (58) han encontrado que el efecto temprano de la IL-6 sobre la diferenciación de las células B humanas es dependiente no sólo de la IL-2, sino también de la IL-1, aunque conviene tener presente que estos resultados fueron obtenidos después de añadir dexametasona al medio de cultivo. De todos modos, es evidente que IL-6 actúa sobre la producción de anticuerpos asociada a varias otras citocinas, las cuales complementan entre sí sus diferentes actividades. Los estudios realizados sobre las actividades biológicas de la IL-6 que se relacionan con la producción de anticuerpos han permitido aclarar que, desde la activación de los linfocitos B hasta la síntesis y la secreción de las inmunoglobulinas por las células plasmáticas, se necesita un conjunto de diversos estímulos proporcionados por diferentes interleucinas. Por sí sola, la IL-6 no incrementa la producción de células plasmáticas en linfocitos B si éstos no han sido previamente estimulados con SA, si en el medio no existen linfocitos T o si éstas han sido tratadas con mitomicina. Por lo tanto, como IL-6 también actúa estimulando los linfocitos TH<sub>1</sub>, se puede decir que la interleucina mencionada coparticipa en la capacitación de las células T, activadas por mitógenos o por antígenos, para que ellas proporcionen una señal o estimulación accesoria [ver artículos de Ceuppens (38), Houssiau (116) y Tosato (306)] que va a permitir incrementar la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B. De este modo, la IL-6 también actúa indirectamente en la respuesta de las células B, al estimular la

producción de IL-2 por los linfocitos TH<sub>1</sub> que se encuentran en el mismo medio de cultivo.

Aparte de las asociaciones señaladas en el párrafo anterior, existen todavía varias más que han sido descritas por otros autores. Por ejemplo, los estudios de Pockley y Montgomery (223), en 1991, han revelado que cuando a un grupo de ratas se les administra, al mismo tiempo y por vía tópica-ocular, una combinación de antígeno (neumococos dinitrofenilados o DNP-Pn) más dosis bajas de IL-5 e IL-6, se incrementa casi tres veces la respuesta secundaria, lagrimal, de anticuerpos IgA anti DNP-Pn. Cabe señalar que esta interacción entre IL-5 e IL-6 ya había sido observada desde 1987, cuando otros investigadores (22) habían informado resultados similares, obtenidos *in vitro*, utilizando tanto células aisladas de la mucosa como otras de origen no mucoso. Estos resultados (223) sugieren que la IL-6 y la IL-5 pueden utilizarse para incrementar la respuesta lagrimal de anticuerpos sIgA dirigidos contra un antígeno particulado y que, posiblemente, en estos eventos también participan otras células inmunocompetentes de la conjuntiva. Existen publicados varios estudios sobre la actividad que tiene la IL-6 en la respuesta de anticuerpos de secreción. La producción local de sIgA se puede mantener, en ausencia de las citocinas, mediante la aplicación de sucesivas dosis del antígeno. En estos casos se observa una menor producción de anticuerpos IgG y casi nada de IgM.

Las diversas interacciones celulares que favorecen la estimulación de la síntesis de anticuerpos por la IL-6, han sido estudiadas por Croft y Swain (43), en 1991. Estos autores han confirmado la participación de la IL-6 como estimulante de los linfocitos B para la inducción de la síntesis de anticuerpos. Sin embargo, sus estudios realizados *in vitro* también revelan que los linfocitos T efectoros (TH<sub>2</sub>) son los mejores promotores de esta actividad. Ellos sostienen que para incrementar la síntesis de anticuerpos no solamente es necesaria la presencia de IL-6 sino que, además, se requiere de la participación de otras citocinas, como IL-4 e IL-2 y también de las interacciones celulares entre los linfocitos T y B. De acuerdo a los resultados de sus estudios, la inducción de la síntesis de anticuerpos en los linfocitos B depende, además, del estado de activación en que se encuentran dichas células. Así por ejemplo, para diferenciarse y secretar IgM, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2α</sub>, los linfocitos B en reposo, pequeños y densos, requieren del contacto directo con las células T y de la presencia de las interleucinas 2, 4 y 6. En cambio, las células B grandes y de menor densidad (tal vez preactivadas *in vivo*) sólo necesitan de la IL-6 para secretar todos los isotipos de Ig.

El grupo de Fujihashi y colaboradores <sup>(70)</sup> ha publicado otro hallazgo importante sobre la acción de la IL-6 en los linfocitos B del apéndice humano. Estos autores señalan que, *in vitro* y en presencia de rIL-6, estos linfocitos producen selectivamente IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub> y que, además, la adición de la interleucina incrementa el número de células productoras de éstos isotipos de Ig. Ellos también observaron que esos mismos eventos no se presentan en los linfocitos B provenientes de las amígdalas y de la sangre periférica. Sin embargo, al estimularlos con PWM, los primeros secretan preferentemente IgA<sub>2</sub> y los segundos producen los dos isotipos. Los mismos autores <sup>(70)</sup> informan que hay un mayor número de células B productoras de IgA<sub>2</sub> en el apéndice que en las amígdalas o en la sangre periférica.

En 1992, Tanner y Tosato <sup>(299)</sup> publicaron nuevos resultados que han conducido a un conocimiento más amplio de lo que es la actividad de la IL-6 sobre los linfocitos B productores de anticuerpos. En esta ocasión ellos informaron que dicha interleucina es capaz de promover el crecimiento y la secreción de inmunoglobulinas, *in vitro*, en la mayoría de las células B linfoblastoides transformadas por el EBV con las que ellos trabajaron (CESS, AMV, 322, RY, TB y TO). La producción de Ig es inespecífica y se presenta cuando la IL-6 estimula la transcripción de los genes para las inmunoglobulinas. En una forma paralela, los mismos autores <sup>(299)</sup> observaron que la misma citocina induce la expresión de los genes c-myc y actina, la cual es dependiente del ciclo celular, en las células mencionadas. Asimismo, encontraron que la adición de IL-6 provocaba notables incrementos de DNA y RNA, de la síntesis de proteínas y del número de células en los cultivos. Estos aumentos llegaron a ser hasta 87, 22, 18 y 6 veces, respectivamente, a las 3 días de iniciada la incubación. Los autores de este estudio creen que la función de la IL-6 en el crecimiento de las células B consiste en permitir que entren en el ciclo celular, actuando durante la transición de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub>.

### 6. 3. Activación de células T.

Diversos experimentos realizados *in vitro* han demostrado que la IL-6 es un factor complementario que interviene en el control de la proliferación de los linfocitos T estimulados por lectinas. Esta interleucina también promueve el crecimiento de los linfocitos T periféricos <sup>(14)</sup> y de los timocitos estimulados con PHA <sup>(56, 82, 108, 164)</sup>. Además, la glucoproteína IL-6 induce la producción de IL-2 y de sus receptores, en los timocitos y en células T estimuladas con mitógeno <sup>(76, 93)</sup>.

La IL-6 influye en la diferenciación de los precursores tímicos hacia células T. Tanto en el timo como en los ganglios linfáticos periféricos, la IL-6 reemplaza la acción de las células accesorias. Su actividad como un factor accesorio, que es necesario para la activación y la proliferación de los linfocitos T, ha sido comprobada mediante experimentos en los cuales los anticuerpos mono y policlonales anti-IL-6 anulan la actividad coestimuladora de los macrófagos o del medio condicionado, derivado de células T, durante la activación de los timocitos (38).

En los linfocitos T humanos, provenientes de las amígdalas y estimulados con PHA, se ha observado que requieren tanto de la IL-6 como de la IL-1 para su proliferación, lo cual también se ha visto en células T murinas (92, 109). Para obtener estos resultados, se necesitan cantidades pequeñas de IL-1. Además, el efecto de esta última interleucina sólo ha sido observado en cultivos con muy bajas densidades de células o en cultivos cuidadosamente carentes de células accesorias (114, 181). Este sinergismo entre la IL-1 y la IL-6 puede entenderse porque la IL-1 contribuye preferentemente a la producción de IL-2, mientras que la IL-6 incrementa preponderantemente la sensibilidad hacia la IL-2 (76, 116, 144).

En subpoblaciones de linfocitos T humanos obtenidos de las amígdalas, se ha comprobado que existe una relación estricta entre la proliferación celular y la capacidad de producción de la IL-2, después de haberse estimulado estas células con PHA, IL-1 e IL-6. La IL-6 también estimula la proliferación de los timocitos maduros  $CD4^{(+)}/CD8^{(-)}$  y  $CD4^{(-)}/CD8^{(+)}$  en combinación con la IL-2 y el  $IFN\gamma$  (313). Varios experimentos adicionales (234) han revelado que la IL-6 también induce un incremento importante del tamaño celular y de la síntesis de proteínas en los linfocitos T. Bajo su efecto, estas células pasan de la fase  $G_0$  a la fase  $G_1$  temprana, en la que son más sensibles a la IL-2. La continuación del ciclo celular está controlada por la IL-1, que es necesaria para inducir la producción de la IL-2. La siguiente Figura muestra la acción de la IL-6 en la activación de las células T.

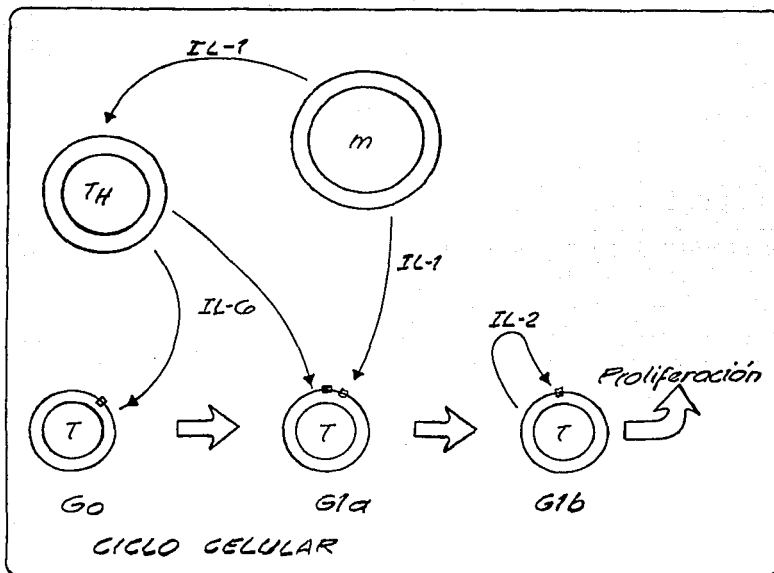


Figura 16. Mecanismos propuestos para explicar los efectos de IL-6 en la activación de los linfocitos T y otras células.

La IL-6 también induce la expresión del receptor de la IL-2 [IL-2R] en una forma que resulta, directamente dependiente de la presencia de la última citocina, ya sea en células murinas o humanas. Se ha visto que, en cultivos de linfocitos T que han sido tratados con IL-6, los anticuerpos anti-IL-2 o anti-IL-2R [anti-Tac] reducen parcialmente las tasas de crecimiento de las células cultivadas, lo cual demuestra la importancia de la primera interleucina en el desarrollo de los linfocitos derivados del timo. Por otra parte,

en estos cultivos, la IL-6 estimula la proliferación de los timocitos y la IL-1 induce la producción de IL-6 e incrementa la sensibilidad de esas células hacia la IL-6 exógena <sup>(76)</sup>.

Otros estudios <sup>(291)</sup> han demostrado que, a diferencia de las células B, los linfocitos T que se encuentran en reposo sí expresan receptores para la IL-6. Los resultados anteriores parecen indicar que el efecto estimulante de la IL-6 en la proliferación de los linfocitos T, se presenta solamente en los estadios iniciales de la activación de estas células. Esto ha sido confirmado mediante experimentos en los cuales se ha observado que la actividad de la IL-6 sólo puede ser bloqueada si los anticuerpos anti IL-6 son suministrados al principio del cultivo. A más largo plazo, la mayoría de las líneas celulares no proliferan con esta interleucina y la expresión del IL-6R disminuye durante la activación de las células T <sup>(58, 291)</sup>.

Para Van Snick y Uyttenhove <sup>(327)</sup> la IL-6 participa en diferentes etapas de la activación de las células T. En una de ellas, observada al comienzo de la activación de linfocitos T humanos y murinos, la IL-6 actúa en una forma independiente de la IL-2. En el otro caso, observado especialmente en los linfocitos T de ratón, la actividad de la IL-6 resulta completamente dependiente de la presencia de IL-2 <sup>(235)</sup>. Recientemente, Lorré y colaboradores <sup>(162)</sup> han propuesto que la IL-6 colabora con la IL-1, vía CD2, durante la activación de las células T y de los timocitos humanos y de ratón. Ellos han observado que, al aumentar la expresión del receptor para la IL-2, tanto en linfocitos T CD4<sup>(+)</sup>/CD8<sup>(-)</sup>, como CD8<sup>(+)</sup>/CD4<sup>(-)</sup>, la IL-6 ayuda a incrementar la sensibilidad de estas células hacia pequeñas cantidades de IL-2. De acuerdo a los resultados de sus experimentos, Lorré *et al* <sup>(162)</sup> informaron que la IL-6 también participa en la inducción de la proliferación transitoria y limitada de las células mencionadas cuando son estimuladas con mitógenos. Este efecto sería independiente de la presencia de IL-2 o de IL-4. De este modo, la IL-6 proveniente de monocitos también puede actuar como un mensajero necesario para la activación de los linfocitos T que han sido estimulados con mitógenos .

#### 6. 4. Estimulación de los linfocitos T citotóxicos.

Junto con la IL-2, la IL-6 también puede inducir la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos [Tc], tanto en poblaciones celulares obtenidas del timo como del bazo, humanas o murinas. Probablemente, esta actividad se debe a que la IL-6

induce la activación de las serina esterasas, que son enzimas necesarias para que se manifieste la función citotóxica de los linfocitos T (214, 293). Algunos autores han señalado que la IL-6 ejerce su efecto estimulante porque facilita la actividad de otras interleucinas. Así por ejemplo, se ha propuesto que la adición de IL-6 al medio de cultivo es suficiente para que los linfocitos Tc CD8<sup>(+)</sup> murinos se vuelvan sensibles a la IL-2. Sin embargo, los resultados de otros estudios parecen indicar que este efecto es más complejo aún, ya que sólo es evidente cuando al cultivo se adiciona, además, la IL-1. Asimismo, se ha observado que en el proceso de la diferenciación de los linfocitos Tc, el efecto estimulatorio de la IL-6 se incrementa si a los cultivos de estas células se les adicionan IL-2 e IFN $\gamma$ , un estímulo antigénico e IL-2, o IL-1 solamente (214, 293).

Desde 1978 se conocía que la inducción *in vitro* de la proliferación de los linfocitos T citotóxicos comienza con la activación inicial de sus células precursoras. Cuando éstas se encuentra en reposo, la activación ocurre por su interacción con antígenos o mitógenos, más la IL-1. Asimismo, también fue demostrado que la presencia en el medio de algunas células como los macrófagos, permite controlar la proliferación de las células T citotóxicas. Por otra parte, los resultados de numerosos estudios han demostrado que para la inducción de la proliferación de las células T también se requiere de la transmisión de una serie de señales transmembranales, las cuales son comunicadas a través de los receptores para linfocinas. Generalmente, la primera señal es la que proporciona el antígeno específico al unirse con el receptor de la célula T. Como un resultado de esa unión ocurre la proliferación y/o la diferenciación de los precursores de los linfocitos T citotóxicos. Por las razones anteriores, se acepta que para la estimulación de la proliferación de los linfocitos Tc se requiere la participación de varios factores inmunomoduladores esenciales, uno de los cuales es la IL-2. Sin embargo, conviene tener presente que la IL-6 también puede actuar como una segunda señal para la producción de la IL-2 por las células TH<sub>1</sub> (164). Mediante experimentos realizados *in vitro* (293) se ha comprobado que las linfocinas requeridas para la proliferación de los linfocitos Tc son producidas por los linfocitos T cooperadores [L3T4<sup>+</sup>] después de su exposición a diversos antígenos extraños o mitógenos. No obstante, los mismos trabajos señalan que también es necesaria la IL-1 producida por los macrófagos. Cabe señalar que las linfocinas necesarias para la inducción de los linfocitos Tc del timo son distintas a las que requieren las células T del bazo, ya que los primeros se encuentran más inmaduros que los segundos (292).



Además, se ha observado que, *in vitro*, la IL-6 es capaz de restablecer las respuestas proliferativas en los cultivos de células T que carecen de células accesorias. Adicionalmente, la IL-6 incrementa las respuestas primarias, alogénicas, de los linfocitos Tc que participan en las reacciones líticas de los cultivos mixtos de linfocitos, cuando éstas contienen cantidades subóptimas de células accesorias. La adición de IL-6 también aumenta la respuesta de los linfocitos Tc en los cultivos de sus precursores tímicos y periféricos, siempre y cuando las células se encuentren en presencia de la IL-2. En estos experimentos, la actividad de la IL-6 se encuentra centralizada exclusivamente en la promoción de la diferenciación de los linfocitos Tc, sin que la interleucina promueva la proliferación de los precursores tímicos. En estas condiciones, IL-6 es activa durante las etapas tardías del cultivo. Por otra parte, la IL-2 es activa durante las etapas tempranas del cultivo y su producción no está inducida por la IL-6 (214, 293).

El grupo de investigadores de Okada (214) ha sugerido que el efecto de la IL-6 sobre la proliferación de las células T estimuladas se lleva a cabo a través de las moléculas CD2, mientras que el efecto de IL-6 sobre la diferenciación de las mismas células depende de las moléculas CD3.

Otros estudios se han enfocado a la acción de IL-6 sobre la inducción de los mecanismos responsables de la citotoxicidad. Desde 1983 se conoce que los linfocitos Tc pueden lisar a sus células blanco mediante la liberación al exterior del contenido de los gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas formadoras de poros (perforinas), TNF $\beta$  y otras proteínas con actividad serina esterasa o serina proteasa (293). En 1986, el equipo de Takai *et al* (292) demostró que la inducción de la actividad citotóxica de los linfocitos Tc *in vitro*, a partir de timocitos, necesita la presencia de la IL-2, del IFN $\gamma$  y de un factor de diferenciación citotóxico [CDF]. Este último factor ha resultado ser idéntico al IFN $\beta$ 2/BSF-2/IL-6. Por otra parte, este mismo grupo de investigadores (292) también encontró que la serina esterasa (un marcador para los gránulos de los linfocitos Tc) sólo se induce en presencia de IL-6 y que el nivel del marcador está relacionado con el grado de citotoxicidad que presentan los linfocitos T citotóxicos Ly-2(+) de ratón.

Por su parte, Lotz *et al* (164) han informado que la IL-6 actúa como un factor estimulante del crecimiento celular en los cultivos de linfocitos T de sangre periférica y de timocitos, previamente estimulados con PHA. Además, Le *et al* (148), en 1988, también han observado que la IL-6, sola o en combinación con la IL-1 o con el TNF $\alpha$ ,

incrementa la proliferación de los timocitos murinos que habían sido estimulados con PHA.

Los estudios del grupo de Renauld *et al* (234), en 1989, confirmaron que, *in vitro*, la IL-6 no es la única citocina responsable del restablecimiento de la actividad citolítica en los cultivos mixtos de linfocitos que contienen pocas células accesorias, sino que, además, se requiere la participación de otras interleucinas, entre las cuales la IL-1 es la más importante. Ambas interleucinas, IL-1 e IL-6, actúan de una manera sinérgica en la inducción de la proliferación de los linfocitos Tc. Los experimentos realizados por estos autores demostraron que la IL-2 y la IL-4 son señales secundarias para este proceso. La actividad estimulante de la IL-6 solamente se presenta en las etapas tempranas del cultivo, es decir en el curso de las primeras 48 horas, mientras que la actividad de la IL-1 se observa en las etapas finales del cultivo. Este mismo equipo de investigadores (234) también encontró que la IL-6 es capaz de inducir una mayor sensibilidad de los linfocitos hacia la IL-2 y que, además, se necesita la adición de IL-6 y de IL-1 para la producción de IL-2 en el cultivo mixto de linfocitos.

## 6. 5. Estimulación de la respuesta de fase aguda.

Una de las actividades biológicas más importantes de la IL-6 es su participación, *in vivo*, en diversos procesos inflamatorios, causados por infecciones, lesiones tisulares por agentes físicos o químicos, tumores malignos y varias entidades patológicas más. Todos estas lesiones o traumatismos tisulares generan en el organismo una serie coordinada de cambios fisiológicos, inmediatos y transitorios, que han sido denominados respuesta de fase aguda. El conjunto de estos eventos tiene como finalidad principal la conservación de la integridad de los tejidos, limitando el área dañada al lugar donde se localiza la lesión. De este modo, la respuesta de fase aguda ayuda a mantener la homeostasis corporal.

### 6. 5. 1. La respuesta de fase aguda.

Uno de los primeros y más antiguos indicios de la respuesta de fase aguda es el conocimiento de que diversas enfermedades, particularmente las infecciones, provocan alteraciones en la composición de la sangre. Desde hace unos 2,500 años, Hipócrates

observó que las enfermedades causaban cambios en el aspecto de algunos líquidos biológicos y propuso que esto eran el resultado de una mezcla inadecuada de cuatro humores que él identificó como la sangre, la pituita o flema, la bilis amarilla y la bilis negra. Fue a partir de 1921 cuando se comenzó a estudiar científicamente la respuesta de fase aguda, al investigarse la razón del incremento de la velocidad de sedimentación de los eritrocitos. Esta es una de las principales alteraciones séricas, observables en el laboratorio, que denotan la presencia de daño tisular. Hoy se sabe que dicho aumento se debe a cambios en la concentración de algunas proteínas plasmáticas que modifican sus tasas de síntesis durante las infecciones.

Las principales proteínas que incrementan su concentración en la sangre y los tejidos durante la respuesta de fase aguda son la proteína C reactiva [PCR], el fibrinógeno, algunos factores de la coagulación, varios componentes del sistema complemento, varias antiproteinasas, la proteína amiloidea A del suero [SAA], la haptoglobina, la hemopexina y otras proteínas más. En cambio, en estos mismos casos disminuye la producción de albúmina, transcortina y transtiretina (279).

En las inflamaciones agudas o crónicas, la primera etapa de la respuesta de fase aguda la constituye la fase local. En un área limitada del organismo, los microorganismos invasores liberan sus antígenos y éstos reaccionan con los anticuerpos formando complejos inmunes. Las dos clases de moléculas pueden iniciar, localmente, una gran variedad de reacciones químicas en la membrana de distintas células, provocando la liberación de numerosos factores humorales que van a desarrollar sus actividades biológicas alrededor del sitio de la lesión. Entre las principales reacciones que se activan localmente se pueden mencionar la activación de los factores de la coagulación, un incremento en el metabolismo de los fosfolípidos, la generación de cininas y la formación de gradientes de sustancias vasodilatadoras y quimiotácticas. Si no se logra detener esta primera etapa localizada, el proceso infeccioso se continúa con una respuesta generalizada o sistémica, que se caracteriza por fiebre, leucocitosis, aumento de la permeabilidad vascular, alteraciones en la concentración de los metales y los esteroides plasmáticos y, finalmente, un incremento en la síntesis de las proteínas de fase aguda [APP] que se producen en el hígado. Otros cambios que también se presentan son el incremento en la síntesis de cortisol, glucagón, catecolaminas y hormonas tiroideas. El conjunto de todos los procesos anteriores provoca una elevación del catabolismo de las proteínas y un aumento de la gluconeogénesis, con un balance negativo de nitrógeno.

La respuesta de fase aguda se activa cuando las reacciones que se llevan a cabo localmente provocan la liberación de varios productos del metabolismo de los fosfolípidos y, además, la activación de diversas citocinas. Todas estas sustancias primero se acumulan alrededor de los tejidos dañados y posteriormente son transportadas hacia la sangre circulante. Los monocitos y los macrófagos [Mφ] activados, que proceden de la sangre periférica, son las células que probablemente inician todos los procesos descritos anteriormente, después que entran en contacto con sustancias u organismos extraños.

Las primeras señales de alarma se transmiten a través de las citocinas IL-1 y TNF $\alpha$ , las cuales activan diferentes moléculas que se encuentran en la superficie de la membrana de las células endoteliales y los fibroblastos, provocando la liberación de otras citocinas, en una respuesta en cascada.

A continuación, otros segundos mediadores de acción más lenta ejercen sus diversos efectos a un nivel sistémico. Estas reacciones causan dolor (mediado por las cininas) y fiebre que depende de la acción sobre el hipotálamo de una serie de sustancias liberadas por los macrófagos, como la IL-1, la IL-6 y los péptidos inflamatorios MIP-1 y MIP-2. Asimismo, la IL-1 y la IL-6 inducen la liberación de ACTH y cortisol, al activar el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. Además, las células de la médula ósea maduran rápidamente y se movilizan hacia la sangre circulante por efecto de los diferentes factores estimulantes de la formación de colonias (G, GM e IL-3) liberados por los tejidos inflamados. En esta etapa también se inician algunas reacciones para la reparación del daño tisular <sup>(150)</sup>.

Por otro lado, el hígado comienza a responder ante la presencia de IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  aumentando la síntesis de las proteínas de fase aguda, lo cual se acompaña de un incremento en la captación de aminoácidos y en la regulación de la gluconeogénesis. De manera simultánea, las dos primeras citocinas también provocan un incremento en la respuesta del sistema inmunitario <sup>(30, 36, 141, 194, 235, 279)</sup>.

Como parecen indicarlo los resultados de varios experimentos realizados *in vitro*, en los hepatocitos la IL-1 y el TNF $\alpha$  activan directamente algunos genes que codifican las proteínas de fase aguda, mientras que otros genes se activan, indirectamente, a través de la IL-6. Es decir, la IL-1, la IL-6 y el TNF $\alpha$  actúan sobre los genes de las APP de una manera sinérgica, en tanto que en otros genes lo hacen en forma aditiva o inhibitoria

(279). Curiosamente, los LPS no inducen la síntesis de APP en los cultivos de hepatocitos pero, sí lo pueden hacer *in vivo* cuando son inyectados en ratas (80). Sin embargo, el grado de inducción de cada proteína de fase aguda, *in vitro*, depende de la especie animal y del tipo celular empleado (235).

#### 6. 5 .2. Participación de IL-6.

La historia de la participación de la IL-6 en la respuesta de fase aguda comienza en 1983, cuando Ritchie y Fuller (239) descubren que los M $\phi$  activados producen una sustancia que puede promover la síntesis de fibrinógeno en los cultivos primarios de los hepatocitos de rata. Ellos mismos informan después que dicha sustancia, denominada factor estimulante de hepatocitos [HSF], es diferente a la IL-1, la cual había sido identificada como la primera molécula producida por los M $\phi$  que estaba implicada en la respuesta de fase aguda. Al año siguiente, Baumann et al (17) mostraron que el HSF controla la síntesis de otras proteínas de fase aguda en las células de un hepatoma humano y en los hepatocitos murinos; asimismo informaron que ese mismo factor también lo producen los queratinocitos. Para 1985 y 1986, ya se tenía conocimiento de que varias citocinas, como la IL-1 y el TNF $\alpha$ , poseían una actividad estimulatoria sobre los hepatocitos que, por lo general, respondían con un incremento en la síntesis de algunas de las principales proteínas de fase aguda (30, 79).

Un año más tarde, en 1987, se conoció que la capacidad del HSF para inducir la producción de las principales proteínas de fase aguda se encontraba compartida por varias citocinas, entre las cuales se encontraban el IFN $\beta$ 2, el BSF-2 y la IL-6 (256). Todas ellas actuaban de una manera similar al factor estimulante de los hepatocitos [HSF], porque inducían la producción de las principales proteínas de fase aguda (259). Finalmente se demostró que todas éstas citocinas, que habían sido caracterizadas por diferentes autores y que habían recibido distintas denominaciones, compartían las mismas características físicas y químicas del HSF derivado de monocitos (79, 227).

En 1988, Ramadori y su equipo de investigadores (229) informaron que, en los cultivos de células de un hepatoma humano [PLC/PRF5], la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL-6 disminuyen la síntesis de albúmina y la formación del RNAm para esta proteína y que, además, esa actividad inhibitoria de las citocinas mencionadas se reduce considerablemente al adicionar al cultivo anticuerpos anti-IL-6 o anti-IL-1 $\beta$ . Por otra

parte, estas citocinas también incrementan la síntesis del tercer componente del sistema complemento [C3] y de la ceruloplasmina, así como la de sus correspondientes RNAm, lo cual indica que ellas actúan a un nivel pre-traducciona.

En los ratones C3H/HeJ (una cepa de animales resistentes a la toxicidad de los LPS), la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el TNF $\alpha$  incrementan la producción del RNAm para la proteína amiloidea A de suero [SAA] y la síntesis del factor B del complemento. Las dos actividades son una función de la dosis de la citocina administrada. Ramadori *et al* (229) también señalaron que la IL-6 es el tercer mediador de la respuesta de fase aguda y el más potente, hasta este momento, entre todos los que actúan directamente sobre los hepatocitos. En ese mismo año, Moshage *et al* (194) demostraron que la inducción de la síntesis de la SAA y de la proteína C reactiva [CRP], promovidas por la IL-1, se encuentra mediada, en parte, por la IL-6. Aunque en los cultivos de hepatocitos humanos se observa que ambas citocinas actúan en una forma aditiva, la última de ellas es la interleucina más potente de todos los inductores de las proteínas referidas. Asimismo, utilizando la línea celular de hepatoma humano HepG2, ellos (194) comprobaron que, *in vitro*, la IL-6 puede inducir la síntesis de varias otras proteínas de fase aguda como el fibrinógeno, la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida y la haptoglobina.

Varios experimentos más, realizados *in vivo*, han permitido demostrar que la interleucina 6 induce reacciones típicas de fase aguda que son similares a las que pueden ser provocadas por la inyección experimental de turpentina. La expresión de los RNAm para las proteínas de fase aguda es más rápida, en presencia de IL-6, que con esa última sustancia (80). Baumann *et al* (19) informaron que la IL-6 y el HSF-III favorecen la síntesis del mismo tipo de proteínas de fase aguda: la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, la  $\alpha$ 1-antitripsina, la ceruloplasmina, el C3, el fibrinógeno, la haptoglobina y la  $\alpha$ -fetoproteína; aunque la IL-6 resultó más eficiente que el factor estimulante de los hepatocitos. Otras moléculas que comparten la capacidad estimuladora de la IL-6 para inducir la síntesis de las proteínas de fase aguda referidas, son el factor inhibidor de las células leucémicas [LIF] y la IL-11 (18).

En 1989, Marinkovic *et al* (169) indicaron que, en los cultivos de las células H-35, la IL-6 y la dexametasona estimulan de una manera sinérgica la síntesis de  $\alpha$ 2-macroglobulina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida y C3, al mismo tiempo que disminuyen la formación del RNAm de la albúmina. Adicionalmente, ellos encontraron que, en

presencia de IL-1, las tres primeras proteínas hepáticas disminuyen su concentración máxima.

Los resultados anteriores permitieron separar en dos grupos las proteínas de fase aguda cuya síntesis era estimulada por la IL-6. Por sí sola o en combinación con glucocorticoides como la dexametasona, la IL-6 estimula la expresión de las proteínas de fase aguda del tipo 2 : fibrinógeno, tiostatina,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina,  $\alpha$ 1-antitripsina y la  $\alpha$ 2-macroglobulina. En cambio, junto con la IL-1, la IL-6 incrementa la expresión de las proteínas de fase aguda del tipo 1 :  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, el tercer componente del sistema complemento C3, la haptoglobina, la hemopexina y la proteína amiloidea A del suero [SAA] (9, 220).

La activación de los genes que codifican para estas proteínas se produce por la acción de la IL-6 a un nivel transcripcional. Algunas investigaciones han revelado que, a este nivel, la IL-6 ejerce un control parcial sobre la síntesis de las proteínas de fase aguda [APP]. En los promotores de los genes de la haptoglobina [HPT], hemopexina [HPX] y la proteína C reactiva [CRP] humanas existen secuencias de nucleótidos que codifican para la síntesis de una proteína, inducida por la IL-6, que es similar a la C/EBP o proteína que se liga al segmento CCAAT en el promotor del gen de la IL-6. El gen de la  $\alpha$ 2-macroglobulina [ $\alpha$ 2M] de rata, también presenta este tipo de secuencias sensibles a la IL-6 (145, 192, 216, 228).

Cabe mencionar que, *in vitro*, para que se presente la inducción máxima de algunas de las APP se necesita la presencia simultánea de la IL-6 y de la dexametasona en el medio de cultivo. La última molécula induce la expresión de los IL-6R en algunas líneas celulares. En otros casos, se requiere de la participación simultánea de IL-1 e IL-6, aunque existen algunos ejemplos de que, en relación a la síntesis de la APP, la primera citocina inhibe el efecto inductor de la segunda (73, 286).

La Tabla siguiente muestra una lista de las proteínas de fase aguda cuya síntesis es inducida por la IL-6, la IL-1 y el TNF. En ella también aparecen las proteínas inducidas por la IL-6 pero, cuya síntesis es inhibida por la IL-1. La clase de APP que puede ser inducida, *in vitro*, por cada una de estas citocinas, varía según la especie y los cultivos de células hepáticas que se empleen (235). Como se puede observar en la Tabla XI, la IL-6 es el mayor inductor de APP.

**TABLA XI. PROTEINAS DE FASE AGUDA PRODUCIDAS EN LOS HEPATOCITOS, POR ESTIMULACION CON IL-6, IL-1 y TNF $\alpha$ .**

| INDUCCION POR IL-6                |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| fibrinógeno                       | [FBG]            |
| $\alpha$ 2-macroglobulina         | [ $\alpha$ 2M]   |
| $\alpha$ 1-inhibidor de proteasas | [ $\alpha$ 1PI]  |
| $\alpha$ 1-antiquimotripsina      | [ $\alpha$ 1ACH] |
| $\alpha$ 1-antitripsina           | [ $\alpha$ 1AT]  |
| inhibidor de la cistefna proteasa | [CPI]            |
| ceruloplasmina                    | [CER]            |
| hemopexina                        | [HPX]            |
| inhibidor de C1 esterasa          | [INHCl-EST]      |
| proteína C reactiva               | [CRP]            |

| INDUCCION POR IL-6, IL-1 ó TNF $\alpha$ | INDUCCION POR IL-6 + IL-1 |
|---|---------------------------|
| $\alpha$ 1 - glucoproteína ácida        | [CRP]                     |
| C3 del Complemento                      | [SAA]                     |
| Factor B del Complemento                | [ $\alpha$ 1GP]           |
| proteína A amiloide sérica              | [HPT]                     |
| proteína P amiloide sérica              | [C3]                      |
| haptoglobina                            |                           |

| PROTEINAS INHIBIDAS POR LA IL-1 |       |
|---------------------------------|-------|
| fibrinógeno                     | [FBG] |
| inhibidor de cistefna proteasa  | [CPI] |

Por otra parte, se ha observado que la concentración de IL-6 se eleva rápidamente en los líquidos biológicos después de las infecciones. El aumento de la IL-6 va asociado con el aumento en la síntesis de las proteínas de fase aguda hepáticas (42, 66, 117, 206). El incremento en los niveles de esta citocina también se han observado en algunos procesos fisiológicos normales y en otros patológicos, como durante la inflamación producida por el trauma de una operación quirúrgica y, además, en enfermedades como la cirrosis alcohólica, o después de un transplante renal (53, 207, 308, 324).



Existe una cantidad abundante de literatura que relaciona los aumentos en la producción de IL-6 con las lesiones tisulares causadas por infecciones agudas del sistema nervioso central, virales o bacterianas, así como con las septicemias y las quemaduras graves. En estos últimos pacientes se ha encontrado que las cantidades de IL-6 producidas se correlacionan con los niveles de PCR en el suero y con la intensidad de la fiebre, lo cual también ha sido considerado sugestivo de que el aumento en la síntesis de IL-6 es la verdadera causa de la respuesta de fase aguda. De igual forma, parece que existe una relación entre los niveles de la IL-6 en el suero y la actividad de algunas enfermedades que evolucionan con fenómenos inflamatorios graves, como es el caso de la artritis reumatoide y el shock séptico (117).

Diferentes autores opinan que la producción de IL-6 contribuye a la defensa del organismo al inducir fiebre y provocar la liberación de ACTH. Se ha observado que la rIL-6 es una molécula con una actividad pirogénica muy elevada, particularmente cuando se inyecta a los conejos (94, 169).

Se puede decir que una de las actividades biológicas mejor estudiadas de la IL-6 es su capacidad de estimular los hepatocitos e inducir la síntesis de un amplio espectro de proteínas de fase aguda. En ratones, la concentración de la IL-6 en el suero se comienza a elevar 30 minutos después de que los animales han sido inyectados con LPS, alcanzando sus niveles máximos dos horas más tarde. Cuando la IL-6 se inyecta por vía endovenosa a las ratas, se ha comprobado que desaparece rápidamente de la circulación porque se une a sus correspondientes receptores [IL-6R] en las células del parénquima hepático (35). Su depuración es un evento difásico, ya que resulta rápido durante los tres primeros minutos y después se hace lento, durante los 55 restantes (35). Algunos autores han propuesto que, una vez liberada a la circulación, la IL-6 se une a la  $\alpha$ 2-macroglobulina formando un complejo (174).

Según experimentos realizados por Castell *et al* (36), en cultivos de hepatocitos humanos, una vez que la IL-6 se ha unido a su receptor de membrana, origina la inhibición de la síntesis de fibronectina [Fn] para la matriz extracelular de las células. Los resultados de esta observación coinciden con los bajos niveles de dicha proteína que se encuentran en el suero de los pacientes, durante una respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo, parece que la síntesis de la Fn puede aumentar o disminuir según la cantidad de IL-6 que estimula los receptores de los hepatocitos. Así por ejemplo, en 1990, Hagiwara y colaboradores (87) encontraron que, tanto en las ratas como en los

cultivos de sus hepatocitos, la rhIL-6 más bien estimula la síntesis de la Fn. De acuerdo a estos últimos resultados, la IL-6 es la responsable de dicha inducción y no la IL-1, como antes se pensaba. Además, los mismos autores <sup>(87)</sup> también observaron que este efecto depende de la dosis de rhIL-6 añadida al medio de cultivo.

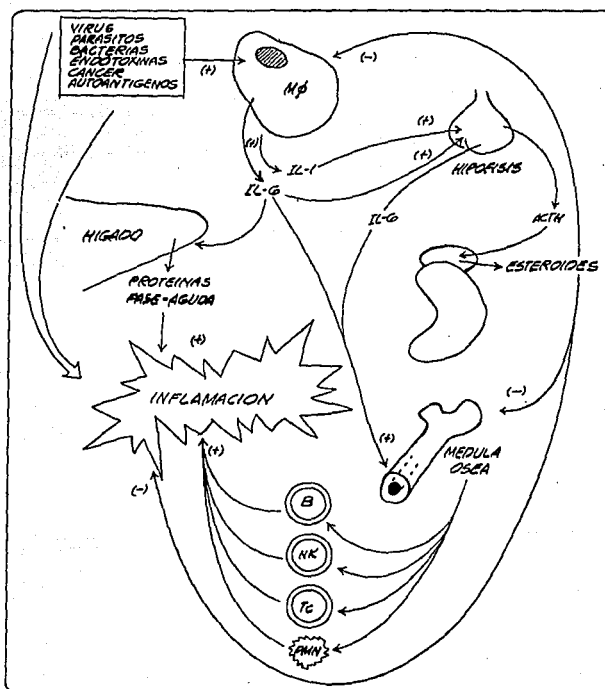


Figura 17. Esquema que reúne algunas de las principales actividades de la IL-6 como un conservador de la homeostasis del organismo, a través de la inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda y de la estimulación de la hipófisis.

Los trabajos con el fin de aclarar el sinergismo entre IL-1 e IL-6 revelaron que, después de añadir IL-1 al medio en donde se cultivan monocitos de sangre periférica [PBM], éstas células son estimuladas para producir IL-6. Además, en los cultivos de hepatocitos de rata, a los cuales se añade medio condicionado proveniente de PBM estimulados con IL-1 o rIL-6, se observa un incremento en la síntesis del RNAm para la Fn <sup>(87)</sup>.

Por otra parte, May *et al* <sup>(177)</sup> han propuesto, en 1988, que las diferencias en el tipo de efecto que ejerce la IL-6, *in vitro*, sobre los hepatocitos de ratas y de humanos, pueden deberse a que los monocitos humanos, estimulados por la IL-1 o por los LPS, son capaces de producir múltiples formas de la IL-6, mientras que, *in vivo*, el efecto de la IL-1 sobre la síntesis de Fn está mediado por la IL-6. En definitiva, todos estos y varios otros experimentos más coinciden en indicar que la IL-1 induce la síntesis de IL-6 y que ésta última incrementa los niveles circulantes de Fn. Los resultados obtenidos también han revelado que, cuando a los cultivos de hepatocitos se añaden IL-6 y glucocorticoides, se presenta una disminución significativa en la síntesis de albúmina <sup>(87)</sup>.

Más recientemente, en 1991, Yap *et al* <sup>(345)</sup>, han realizado observaciones muy interesantes acerca del control de la inducción de la respuesta de fase aguda, en cultivos primarios de hepatocitos humanos. Ellos han encontrado que el TNF $\alpha$  es un inhibidor de la síntesis y de la secreción de la CRP y la SAA, después que éstas habían sido inducidas por IL-1, IL-6 o ambas, en presencia de la dexametasona. En apoyo a esta observación ellos también han observado que si al medio se adicionan anticuerpos anti TNF $\alpha$ , se incrementa la síntesis de CRP y SAA. Además, sus experimentos revelan que el TNF $\alpha$  estimula la síntesis de SAA a largo plazo (2-3 días) e inhibe la síntesis de PCR. Los resultados de los experimentos anteriores ponen de manifiesto que la producción de las proteínas de fase aguda posee diferentes mecanismos para su control y que éstos pueden estar mediados por distintas citocinas.

Por otro lado, los escasos estudios que se han realizado sobre la respuesta de fase aguda en el curso de las infecciones parasitarias en los humanos, han revelado que la clase de APP producidas depende del tipo de parásito involucrado. De esta manera, se ha llegado a conocer que en el caso de infecciones por varios *Plasmodium spp* se eleva la concentración plasmática de la fracción  $\alpha_1$  de las APP, sin relación con la severidad de la enfermedad, con la duración de la fiebre o con el grado de parasitemia. Además, en niños con parasitosis intestinal múltiple, causada por *Giardia*, *Hymenolepis*,

*Entamoeba* y *Ascaris*, se han encontrado disminuídos los niveles de albúmina sérica y esta misma situación ha sido demostrada en púberes que no pueden subir de peso y que están infectados con los dos primeros parásitos. Las investigaciones realizadas con animales de laboratorio han revelado que, al contrario de lo que sucede en el hombre, en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* o *Nippostrongylus brasiliensis* sí se presenta una relación entre los cambios en la producción de ciertas APP, el grado o la extensión de la enfermedad y la parasitemia (279).

Actualmente se sabe que, durante los procesos infecciosos, la producción de diversas citocinas, entre las que se encuentran la IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , así como sus acciones combinadas, influyen directamente en el curso de la enfermedad regulando la respuesta inmunitaria del huésped hacia los microorganismos patógenos de origen externo. Dichas actividades ayudan al hospedero en su resistencia hacia los patógenos, porque las citocinas estimulan otras células, incrementan la respuesta inmunológica, provocan fiebre, destruyen ciertos microorganismos invasores en una etapa dada de su desarrollo o producen opsoninas como la PCR. Todos estos efectos se llevan a cabo a través de las distintas actividades biológicas que presentan las tres citocinas señaladas (303), las cuales aparecen resumidas en la Tabla siguiente.

**TABLA XII. ACTIVIDADES DE LAS PRINCIPALES CITOCINAS RELACIONADAS CON LA RESPUESTA ANTIINFECCIOSA.**

|  | IL-1                                | IL-6                                 | TNF                                |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>FUENTE DE LAS CITOCINAS</b>   | macrófagos queratinocitos endotelio | macrófagos linfocitos T linfocitos B | macrófagos linfocitos T células NK |
| <b>INDUCCION DE :</b>  |                                     |                                      |                                    |
| <b>fiebre</b>  | (+++)                               | (+)                                  | (++)                               |
| <b>APP</b>   | sf                                  | sf                                   | sf                                 |
| <b>TNF</b>   | sf                                  | no                                   | sf                                 |
| <b>IL-1</b>  | sf                                  | no                                   | sf                                 |
| <b>IL-6</b>  | sf                                  | sf                                   | sf                                 |
| <b>DIFERENCIACION Y/O ACTIVACION DE MACRÓFAGOS Y LINFOCITOS T Y B.</b> | sf                                  | sf                                   | sf                                 |

En 1991, Utsunomiya *et al* <sup>(312)</sup> encontraron que existe un orden secuencial en la síntesis local de las citocinas inflamatorias IL-1 e IL-6, durante la pleuritis inducida con carragenina en las ratas. Además, los animales presentan una migración de leucocitos polimorfonucleares [PMN] hacia la pleura, lo cual coincide con los niveles máximos de ambas interleucinas. De acuerdo a estos experimentos, se pudo comprobar que primero se produce la IL-1 y poco después se origina la síntesis de IL-6, cuyos valores máximos de secreción alcanzaron, en el exudado pleural, las 700 U/ml a las 3 horas y las 6,000 U/ml a las 5 horas siguientes a la inyección del inductor, respectivamente. Esta última citocina llegó a su nivel más alto en suero (30 U/ml) 4 horas después de la inoculación de la carragenina. El mismo resultado, pero de aparición mucho más rápida, se obtuvo después de la administración intrapleural de rhIL-1. Asimismo, ya sea por la carragenina o por la IL-1, la inducción de IL-6 promovió la síntesis de T-cinínogeno, el cual fue encontrado elevado en el suero de las ratas. Resultados similares ya habían sido informados previamente por Gaudie *et al* <sup>(78)</sup>, así como por Geiger *et al* <sup>(80)</sup>. Los niveles de la primera interleucina disminuyeron considerablemente al inyectar la rhIL-1 $\alpha$  en combinación con anticuerpos anti rhIL-1 $\alpha$ . En los cultivos de células H4IIEC3 de hepatoma de rata, igualmente se produjo T-cinínogeno inducido por rhIL-6, en una forma dependiente de la dosis. Este efecto se revirtió al añadir al medio el suero anti rhIL-6.

Los autores de este trabajo piensan que el aumento de la IL-6 en el suero de los animales con la pleuritis experimental pudo ser producida por las células sanguíneas, por las células del endotelio vascular o por los leucocitos de exudado pleural, y que luego la interleucina se difundió hacia la sangre circulante. Asimismo, ellos opinan que la migración de los PMN pudiera ser una respuesta del organismo hacia los aumentos observados en la síntesis de IL-1 o IL-6. Además, los mismos autores <sup>(312)</sup> proponen que en la respuesta inflamatoria aguda de las ratas también participan otras citocinas como el TNF $\alpha$  y la IL-8.

## **6. 6. Estimulación de la hematopoyesis.**

Los primeros efectos que se conocieron al estudiar la actividad de la IL-6 sobre la hematopoyesis, fueron su capacidad de estimular la proliferación de las células progenitoras de granulocitos y macrófagos, dando lugar a la formación de colonias de

multilínea y, de una manera indirecta, propiciando la formación de colonias de blastos en cultivos de células del bazo, provenientes de ratones normales <sup>(132)</sup>.

El efecto que tiene IL-6, de aumentar la proliferación de los progenitores hematopoyéticos multipotenciales, fue descrito en 1987, por Ikebuchi *et al* <sup>(118)</sup>, como una actividad biológica dependiente de la IL-3. Sin embargo, como un estimulante de los tejidos hematopoyéticos, la IL-6 puede colaborar de manera sinérgica con la IL-3 y otras citocinas. Su actividad provoca que las células madres primitivas, no cíclicas, de la médula ósea (es decir, los progenitores multipotentes) entren al ciclo celular y que, por otra parte, disminuyan el tiempo en se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del mismo. De todos modos, es necesario señalar que para producir este efecto estimulatorio de la hematopoyesis, la IL-6 debe actuar tempranamente, capacitando así a las células de la médula ósea para que sean sensibles a los factores clásicos que estimulan el crecimiento del tejido hematopoyético <sup>(132, 330)</sup>.

El equipo de Ikebuchi <sup>(118)</sup> observó que, en presencia de IL-3 e IL-6, las células extraídas del bazo de ratones inyectados con 5-fluoruracilo, aceleran la formación de colonias multipotenciales, tanto de blastos como de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos. Por su parte, las células de la médula ósea formaron colonias de multilínea GMM (granulocito / macrófago / megacariocito), en presencia de ambas interleucinas, sin aumentar la velocidad de proliferación de las células, el número de colonias o su tamaño.

Actualmente se conoce que la acción sinérgica de ambas interleucinas permite mantener la formación de colonias de células blásticas, con multilínea, en los cultivos de células de bazo de ratón. Estos y otros resultados han permitido proponer que la IL-6 activa a las células madres hematopoyéticas que se encuentran en la fase G<sub>0</sub>, para que entren a la fase G<sub>1</sub>. IL-6 ya no actúa sobre células progenitoras más maduras. Sin embargo, otros autores <sup>(132, 140, 151)</sup> han sugerido que, más bien, la IL-6 incrementa la susceptibilidad de los progenitores hematopoyéticos, multipotenciales, hacia la IL-3, quizás a través de un control positivo de los receptores para ésta última.

Cuando la IL-6 y la IL-3 se añaden a cultivos de células no adherentes de la médula ósea de ratón, al poco tiempo incrementan casi 5 veces el número de células formadoras de colonias. Kishimoto <sup>(132)</sup> menciona los trabajos de Okana *et al*, quienes han observado que si estas últimas células se preincuban con IL-3 e IL-6, antes de ser

transplantadas a receptores irradiados letalmente, los animales alcanzan una tasa de supervivencia del 90%, a los 30 días de su trasplante, en contraste con el 20% de supervivencia que se obtiene regularmente cuando las células no son preincubadas con las interleucinas.

Un efecto más de la IL-6 en el proceso de la hematopoyesis es su capacidad de estimular la proliferación de las células progenitoras de los granulocitos y macrófagos, humanos y murinos. En este caso, el efecto de la IL-6 es menos potente que el que ejerce el GM-CSF sobre dichas células (342). Asimismo, se ha informado que la IL-6 tiene un efecto sinérgico con el GM-CSF y con el M-CSF, lo cual ha sido comprobado en cultivos de células progenitoras purificadas (25, 107). También se ha encontrado que, *in vitro*, la IL-6 estimula la maduración de los megacariocitos de ratón. El equipo de Leven y Rodríguez (154) ha trabajado estudiando los efectos de la rIL-6 sobre cultivos de los megacariocitos aislados y purificados de la médula ósea de cobayos. Sus resultados revelan que la IL-6 es capaz de estimular la maduración de estas células en cultivos libres de suero, incrementando, además, su tamaño y fragmentación citoplásmica, formando preplaquetas que presentan la ultraestructura de las plaquetas circulantes normales. Estos resultados concuerdan con los que habían sido informados previamente por otros investigadores (119, 335, 340), los cuales mostraron, primero, que la IL-6 puede potenciar el crecimiento de colonias de megacariocitos, en presencia de la IL-3 y, en segundo lugar, que la IL-6 aumenta el tamaño celular en los cultivos de megacariocitos (340).

Aunque se desconoce la forma en que la IL-6 promueve la formación de plaquetas, se sabe que, inyectada en ratones, produce un aumento en la cuenta plaquetaria y en el tamaño de los megacariocitos (119). Hill *et al* (96), en 1989, también han comprobado un incremento en la producción de plaquetas y en el número de progenitores de megacariocitos, en ratones tratados con IL-6, por lo que proponen que *in vivo*, ésta última comparte dicha actividad con la trombopoyetina.

## 6. 7. Inhibición de la proliferación de líneas celulares.

Otra actividad biológica importante que manifiesta la IL-6 es un efecto antiproliferativo sobre algunas líneas celulares leucémicas, mieloides, murinas y humanas, y sobre varias líneas celulares de carcinomas y linfomas. Además de inhibir su crecimiento, la IL-6 provoca que estas células muestren características morfológicas y actividades específicas de las células más diferenciadas (47, 132, 235, 330). Este efecto lo

comparte la IL-6 con otras sustancias como el G-CSF, el factor inhibitorio de leucemia [LIF] y el inductor 2 de la proliferación de granulocitos y macrófagos [MGI-2]. Sachs *et al* <sup>(243)</sup> han informado que este último factor es idéntico a la IL-6 y que su producción puede ser inducida en las células hematopoyéticas normales, por la IL-3, por tratamientos químicos o por condiciones de cultivo que promueven la diferenciación de las células mieloleucémicas. Curiosamente, el LIF es capaz de inducir la producción de grandes cantidades de IL-6 en las células M1 <sup>(132)</sup>.

Por lo que respecta al efecto que manifiesta la IL-6 en la diferenciación de las células M1 murinas, se ha observado que esta citocina provoca su diferenciación hacia macrófagos. Entre los cambios que induce la IL-6 en dichas células están la detención de su crecimiento y el aumento de su citoplasma, al día siguiente de su adición y, al tercer día, una completa diferenciación morfológica. En relación a estos últimos cambios, se ha visto que las células M1 incubadas con IL-6 incrementan su fagocitosis y la expresión de receptores para Fc y para C3d, además de aumentar los niveles de (2'-5') sintetasa A, que es una enzima inducible por IFN e indicadora de la diferenciación en varias células leucémicas <sup>(47,187)</sup>. Sin embargo, no todas las células de leucemia mieloide son capaces de diferenciarse en presencia de IL-6. Algunas de ellas, por el contrario, muestran una estimulación de su crecimiento <sup>(217)</sup>.

Por otra parte, algunas líneas celulares la necesitan, junto con otras citocinas, para poder diferenciarse. Tal es el caso de las células U937, en las que la IL-6 y el IFN $\gamma$  actúan de manera sinérgica. Además de madurar, dichas células detienen su crecimiento y aumentan sus niveles de la enzima (2'-5') sintetasa A. Por estas razones, se ha propuesto que en la diferenciación de las células U937 y THP-1, existe un sinergismo entre la IL-1 y la IL-6 <sup>(45, 247)</sup>.

Varios estudios realizados *in vitro*, en los que se han empleado células leucémicas de sangre periférica obtenidas de pacientes con leucemia mielógena aguda, han mostrado que estas células responden a la IL-6 reduciendo el número de blastos e incrementando las formas mielomonocíticas <sup>(236)</sup>. Además, se ha observado que la rIL-6 ejerce un efecto estimulatorio notable sobre la expresión de los receptores superficiales para el Fc de la IgE, en las líneas celulares de monocitos humanos U937 y THP-1. En el primer caso, éste efecto se sinergiza con la IL-4 (la más potente). Las células THP-1 y las Mac-6 también incrementan la expresión de la molécula CD23 en presencia de IL-6 <sup>(339)</sup>, lo cual denota la participación de la IL-6 en la diferenciación de dichas líneas celulares.



## 7. Métodos para medir la concentración de IL-6

---

### 7. 1. La interleucina.

Se presenta un breve resumen de los diferentes métodos empleados para cuantificar o determinar la presencia de IL-6 en los tejidos, o en los líquidos biológicos, así como en el sobrenadante de los cultivos de células que la producen y la secretan al medio .

La curva estándar, necesaria para la cuantificación de la interleucina puede hacerse con IL-6 recombinante o natural. La rIL-6 se puede obtener en células de *Escherichia coli* o de levadura (177).

Cada proveedor o productor incluye las unidades de IL-6 que posee su preparación. Así por ejemplo, Genetics Institute de Boston, informa que 1 U/ml de su producto corresponde a casi 20 pg de rhIL-6. En los Institutos Nacionales de Salud, Maryland, USA, varios investigadores consideran que la misma cantidad corresponde a 5.5 U/ml (298). El paquete comercial de InterTest-6, para medir la concentración de la citocina por medio de una prueba de ELISA, posee una sensibilidad de 156 pg/ml para la IL-6 (175).

La actividad de la rIL-6 comercial ha sido determinada, generalmente, en un rango de  $1 \times 10^{6-9}$  U/mg de proteína, utilizando como indicador de la actividad de la interleucina la estimulación de células B o de células de hepatoma (331). La rhIL-6 preparada en *Escherichia coli* tiene una actividad de  $3.9 \times 10^9$  U/mg en la línea celular linfoblastoide SKW6-CL4 dependiente de IL-6 (240). La misma interleucina, obtenida en levaduras por Genzyme Corporation, Boston MA, posee una actividad específica de  $1 \times 10^7$  U/mg de proteína (339). Kishimoto ha informado una actividad de  $5.3 \times 10^6$  U/mg para la IL-6 preparada en su laboratorio de Osaka, Japón (278), mientras que Vita informa que la rhIL-6 producida por él contiene  $1 \times 10^8$  U/mg (245). Otros autores han comunicado que la IL-6 recombinante murina posee una actividad de  $13 \times 10^6$  U/mg.

## **7. 2. Métodos cuantitativos.**

### **7. 2. 1. Bioensayos.**

#### **7. 2. 1. 1. Proliferación celular.**

En este inciso se mencionan aquellas pruebas que han sido diseñadas tomando en cuenta la proliferación o crecimiento de líneas celulares de hibridomas o plasmocitomas murinos que sólo responden a la presencia de IL-6 en el medio y no lo hacen ante las otras citocinas conocidas. Entre las líneas celulares que proliferan cuando la IL-6 se adiciona al medio se pueden mencionar las líneas celulares de hibridoma murino B9, MH60.BSF-2 y 7TD1, así como las células T 1165 y TEPC-2027 de plasmocitoma murino <sup>(182)</sup>. Las células B9 de hibridoma murino tienen su crecimiento máximo cuando la IL-6 del medio alcanza concentraciones entre 5 y 10 pg/ml. De todos modos, su estimulación por esta interleucina permite demostrar su presencia aún a concentraciones de 0.3 pg/ml, en muestras de plasma o de médula ósea, en medios condicionados o en suero separado de sangre periférica <sup>(240)</sup>.

Para la mayoría de estas líneas celulares, una unidad de IL-6 se define como la concentración de dicha citocina o el valor recíproco de la máxima dilución de la muestra, que produce la mitad de la máxima incorporación de timidina al núcleo, tomando como referencia la preparación estándar que corresponde a 1 pg de la interleucina [1U = 1 pg de IL-6] <sup>(431)</sup>. Para el caso de la línea celular de hibridoma murino MH60.BSF-2, un ng de rIL-6 corresponde, aproximadamente, a 5 U/ml de actividad <sup>(172)</sup>. En las células 7TD1, 5 pg de IL-6 corresponden aproximadamente a 1U de ella. La proliferación o el crecimiento de todas estas células se mide por incorporación de timidina tritiada [<sup>3</sup>H]-TdR y la radioactividad se cuantifica mediante espectroscopía líquida de centelleo.

#### **7. 2. 1. 2. Producción de anticuerpos.**

IL-6 puede inducir la secreción de anticuerpos en células B humanas que han sido preactivadas o transformadas por el EBV. Entre éstas se pueden mencionar algunas líneas celulares B linfoblastoides humanas como la CESS y las células SKW6-CL4. Las primeras son productoras de IgG. En ellas, 1U de IL-6 corresponde a la concentración de la citocina que, a los cuatro días de cultivo, induce la mitad de la máxima secreción

de esta inmunoglobulina, en un medio que contiene  $1 \times 10^6$  células (169). El segundo tipo de células produce IgM. En sus cultivos, 1U/ml es igual a la cantidad de IL-6 que genera la mitad de la máxima producción del anticuerpo referido en  $1 \times 10^4$  células suspendidas en el medio durante 3 días (240).

### 7. 2. 1. 3. Producción de proteínas de fase aguda.

La inducción de la producción de proteínas de fase aguda, *in vitro*, se puede obtener utilizando células de hepatoma, humanas y murinas, o *in vivo*, inyectando la muestra en ratas y ratones. Las células de hepatoma humano más conocidas son PLC/PRF5 y HepG2 productoras de C3 y ceruloplasmina, fibrinógeno o haptoglobina, respectivamente (19, 229). También se utilizan las células de hepatoma de rata H-35 que sintetizan  $\alpha$ 2-macroglobulina, hemopexina, tiostatina y fibrinógeno, las células de hepatoma murino Hep3B2 y la línea celular FAZA 967 de hepatoma de rata, ambas productoras de fibrinógeno, así como los cultivos de hepatocitos, humanos, murinos y de rata.

Los niveles de las proteínas de fase aguda en el plasma se determinan empleando técnicas inmunológicas como la inmunoelectroforesis en cohete, la inmunodifusión radial o el electroenfoque en gel de SDS-PAGE que contiene anfolitos. En todos estos procedimientos el revelado puede hacerse con azul de Coomassie. Otro procedimiento es el ELISA de sandwich.

### 7. 2. 2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

a) Sandwich. Un anticuerpo monoclonal anti IL-6 humano se puede usar como la tapa inferior del sandwich, cubriendo la microplaca del ensayo. Se agrega el fluido biológico o el sobrenadante que contiene la IL-6 a cuantificar (también puede tratarse de la rhIL-6, de la cual se emplean distintas concentraciones conocidas, para hacer una curva patrón). Luego se adiciona otro anticuerpo policlonal de conejo anti IL-6, se añade un suero de cabra, anti conejo, acoplado a peroxidasa de rábano y se revela la reacción con el sustrato dihidrocloruro de o-fenilendiamina. Los resultados de la muestra problema se interpolan en la curva patrón (175).

b) **Fluorescencia-sandwich.** Es un método parecido al anterior, en donde se emplea un primer anticuerpo anti IL-6, la muestra o el estándar, el segundo anticuerpo conjugado y luego, estreptoavidina-fosfatasa alcalina, que se revela con LUMI-PHOS. La intensidad de la luminiscencia se determina con un lector para esta última <sup>(110)</sup>.

### 7. 2. 3. Radioinmunoensayo [RIA].

Para esta técnica se utiliza un suero policlonal de conejo, anti rIL-6, el cual se mezcla con el suero o la muestra de algún líquido biológico de los pacientes. Posteriormente se agrega <sup>125</sup>I-rhIL-6. Después de la reacción antígeno-anticuerpo ambas citocinas (la libre y la unida al anticuerpo) son separadas por precipitación o centrifugación en un gradiente y la radioactividad de la IL-6 ligada a los anticuerpos se mide mediante un contador gamma <sup>(71)</sup>.

## 7. 3. Métodos cualitativos.

### 7. 3. 1. Cromatografía de afinidad.

En este procedimiento se utiliza un suero anti IL-6 de conejo, ligado por unión cruzada a una columna de sepharosa, la cual ha sido activada con bromuro de cianógeno. La muestra que contiene la IL-6 a cuantificar se pasa por esta columna, eluyéndola con una solución amortiguadora de glicina, a pH ácido y el contenido de los eluatos es separado por SDS-PAGE, en condiciones reductoras. Las proteínas separadas por la electroforesis se pasan a papel o tiras de nitrocelulosa, por medio de electricidad y la interleucina se identifica mediante un suero anti rIL-6, utilizando como revelador el complejo avidina-biotina <sup>(289)</sup>.

### 7. 3. 2. Inmunoprecipitación.

Un suero policlonal de conejo anti-rIL-6 precipita a la rIL-6 marcada con [<sup>35</sup>S]-metionina; la IL-6 del precipitado es separada por SDS-PAGE y la radioactividad del gel se autoradiografía en una placa fotográfica <sup>(177)</sup>.

### 7. 3. 3. Inmunoblotting.

La IL-6 se separa por electroforesis en gel [SDS-PAGE], luego se transfiere electroforéticamente a una hoja de nitrocelulosa, a la cual se agrega, primero, suero anti IL-6 y después, un conjugado radiomarcado (un anticuerpo marcado con un isótopo radiactivo, dirigido contra el anticuerpo anti IL-6). Finalmente se obtiene una autoradiografía del gel <sup>(177)</sup>.

### 7. 3. 4. Inmunohistoquímica.

A los tejidos fijados con formalina, se les adiciona suero policlonal de conejo anti rIL-6; después se agregan anticuerpos de cabra conjugados con biotina, dirigidos contra los anticuerpos del suero de conejo. Luego se añade peroxidasa conjugada con avidina-biotina y se revela con 4-cloro-1-naftol en presencia de peróxido de hidrógeno <sup>(288)</sup>.

## 8. Otras actividades biológicas de la IL-6

---

### 8. 1. IL-6 y sistema nervioso.

La capacidad de la IL-6 para ejercer diversas actividades, en distintos tipos de células, parece ser una propiedad más extensa de lo que inicialmente se había supuesto. En un capítulo anterior se hicieron comentarios acerca de IL-6 como un estimulante de la proliferación del tejido hematopoyético, de varias subpoblaciones de linfocitos T y de algunas líneas de células tumorales derivadas de linfocitos B, así como, además, se revisó su actividad como un estimulante de la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos. Se puede decir que la IL-6, junto con las citocinas  $TNF\alpha$  e IL-1, está reconocida como uno de los principales mediadores de las respuestas inflamatorias de los organismos vertebrados. Sin embargo, sus actividades se extienden a otros tejidos diferentes a los que han sido mencionados hasta ahora. IL-6 también puede actuar sobre los tejidos que forman parte del hipotálamo y sobre varias glándulas de secreción interna. La capacidad que tiene IL-6 para estimular las células del sistema neuroendócrino parece indicar que esta interleucina es un mediador que participa activamente como un mensajero de las interacciones entre ese sistema y el inmunitario, en el curso de las reacciones inflamatorias.

Así como IL-6 y otros mediadores de la respuesta del sistema inmunitario pueden influir sobre algunas actividades de las células del sistema neuroendócrino; existe abundante evidencia en favor de que, simultáneamente, los mediadores de las respuestas del sistema nervioso también pueden modificar las actividades de algunas subpoblaciones de linfocitos. Es decir, que entre los sistemas neuroendócrino e inmunitario se presenta una comunicación bidireccional.

La idea de que el sistema nervioso regula las respuestas inflamatorias e inmunológicas del cuerpo es un concepto que fue propuesto hace ya varias décadas. Desde entonces a la fecha se ha acumulado numerosa evidencia clínica en favor de esa proposición. Sin embargo, la interacción entre los productos de las neuronas y los

linfocitos sólo se pudo comprobar cuando se descubrieron receptores para neuropéptidos en la superficie externa de la membrana de los leucocitos .

Más recientemente, en el año de 1988, el grupo de investigadores de Lotz <sup>(165)</sup> ha encontrado que, en los cultivos de monocitos de sangre humana, los neuropéptidos conocidos como sustancias P y K [SP y SK] pueden controlar de una manera potente y específica la producción de las citocinas inflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Las cantidades máximas de dichas citocinas inducidas se obtienen cuando a los cultivos de dichas células se les adicionan concentraciones entre  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  M de los neuropéptidos mencionados. Además, el mismo grupo de investigadores <sup>(165)</sup> observó que el empleo de antagonistas de la SP (la misma molécula pero, con varios aminoácidos-L sustituidos por sus isómeros D), disminuye la cantidad de IL-1 e IL-6 producida en los cultivos de monocitos.

La producción de mediadores inmunológicos por las células del sistema nervioso es un evento conocido desde hace varios años. Asimismo, se han publicado resultados en favor de que la IL-6, el TNF $\alpha$  y la IL-1 pueden ser sintetizados a nivel del hipotálamo. En el ratón, las mismas citocinas también pueden ser producidas por otras células del sistema nervioso, como los astrocitos de la microglía del cerebro <sup>(67)</sup>. Diferentes experimentos realizados *in vitro* han demostrado que estos tejidos del sistema nervioso pueden producir los tres mediadores inmunológicos ya mencionados cuando son infectadas con el virus de la estomatitis vesicular y con el virus linfocítico de la coriomeningitis <sup>(66)</sup>. Además, en ambos tipos de células, las dos últimas citocinas también inducen la producción de la primera.

Por su parte, Righi *et al*, en 1989 <sup>(238)</sup>, mostraron que algunas líneas de células de la microglia incrementan su producción *in vitro* de IL-1, TNF e IL-6 cuando se les añaden LPS al medio de cultivo. Para algunos investigadores <sup>(66, 67)</sup>, la síntesis de estas citocinas en el sistema nervioso central [SNC] puede desempeñar dos funciones distintas. La primera sería reparar el tejido nervioso infectado y la segunda, activar las células del sistema inmunitario .

Además de los trabajos anteriores que demuestran la producción de IL-6 por las células del cerebro, existen otras publicaciones que refieren la existencia de células del sistema nervioso que pueden responder a la estimulación por la IL-6. Esto quiere decir que en el cerebro se producen tanto la interleucina como sus receptores específicos. Así

por ejemplo, al añadir IL-6 a cultivos de astrocitos, las células estimuladas responden con un incremento en la secreción de una sustancia neurotrópica llamada factor de crecimiento nervioso [NGF] <sup>(67)</sup>. Asimismo, otros trabajos <sup>(88)</sup> han revelado que, añadida al medio de cultivo, la IL-6 incrementa la supervivencia de las neuronas colinérgicas obtenidas de la región septal del cerebro de ratas de 10 días de edad y, además, actúa de manera sinérgica con el NGF .

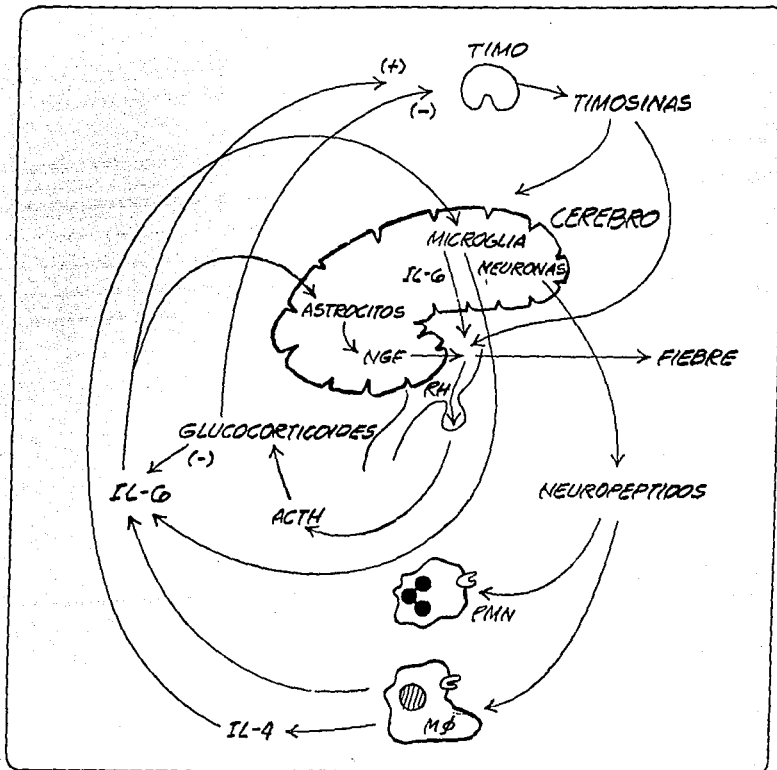
La IL-6 también parece actuar como un factor estimulante del crecimiento de las células del sistema nervioso, ya que puede inducir la diferenciación de una línea celular procedente de un feocromocitoma de rata <sup>(247)</sup>. Se ha considerado que todas estas actividades locales de la IL-6 sobre el sistema nervioso tienen como finalidad activar las defensas del cuerpo y promover la reparación celular. Frei y sus colaboradores <sup>(67)</sup> han sugerido que la IL-6 participa en la estimulación del crecimiento de las neuritas porque aumenta la secreción del NGF. En apoyo del punto de vista anterior, se ha observado que, varios días después de la estimulación con IL-6, se inicia la diferenciación típica de la línea celular PC-12 cuyos elementos se transforman en células nerviosas. Ello involucra el mantenimiento de su viabilidad y algunos cambios morfológicos, hasta que las células cultivadas adquieran las prolongaciones alargadas de las neuritas. Las células PC-12 expresan alrededor de 1,200 receptores para IL-6/célula, con una Kd aproximada de  $1.8 \times 10^{-9}$  mol/L. Simultáneamente, las mismas células presentan una expresión transitoria del proto-oncogene c-fos y del número de canales para el desplazamiento del ión  $\text{Na}^{2+}$  a través de la membrana plasmática. Estos efectos de la IL-6 sobre dichas células son similares a los que se presenta cuando la estimulación se provoca con el NGF, aunque cada una de las dos moléculas actúa sobre sus respectivos receptores <sup>(132, 200, 247)</sup>.

Tal como lo indicaron recientemente Lieberman y sus colaboradores <sup>(157)</sup>, los astrocitos del sistema nervioso central parecen ser las principales células productoras de IL-6 durante las infecciones agudas. Estos autores observaron la producción y la secreción de IL-6 al medio de cultivo cuando los astrocitos de rata eran estimulados con LPS y con el virus de Newcastle. En otros trabajos realizados casi paralelamente con los anteriores, se ha encontrado la expresión de RNAm para IL-6, en las células de glioblastoma o astrocitoma, después de haber sido estimuladas *in vitro* con IL-1.

Existe la posibilidad de que la IL-6 sea considerada como un neuromodulador, ya que ella actúa controlando la síntesis o la secreción de algunas hormonas liberadoras (RH)



producidas en el hipotálamo, tal como lo han mencionado recientemente Hama *et al* (88). Por otro lado, Naitoh y sus colaboradores (200) han demostrado que, en el hipotálamo, la IL-6 incrementa la liberación del factor liberador de corticotropina [CRF].



**Figura 18.** El esquema simplifica las interacciones que existen entre los sistemas neuroendócrino e inmunitario y, asimismo, destaca la participación de la IL-6 como un mediador de algunas de ellas.

## 8. 2. IL-6 como estimulador del sistema endócrino.

### 8. 2. 1. Pituitaria anterior.

Existen numerosas pruebas de que los sistemas inmunitario y neuroendócrino se encuentran funcionalmente interrelacionados. Algunas citocinas inmunológicamente activas pueden influir sobre la secreción de hormonas en la porción anterior de la glándula pituitaria, de una manera directa o a través del hipotálamo <sup>(33, 274)</sup>. La IL-6 es una de esas citocinas que participan en la inducción de reacciones inflamatorias y, simultáneamente, estimulan la liberación de hormonas hipofisarias <sup>(200, 274)</sup>.

Las células del eje hipotalámico-pituitario-adrenal pueden ser estimuladas por la IL-6, *in vitro*, utilizando concentraciones similares a las que inducen la mitogénesis de las células del bazo estimulada por fitohemaglutinina [PHA] <sup>(274)</sup>. Por otra parte, la administración de LPS en voluntarios humanos ocasiona la producción y la liberación a la circulación de la hormona del crecimiento [GH], la hormona adrenocorticotrópica [ACTH] e IL-6, lo cual sugiere que en las septicemias se puede presentar una producción tanto local como sistémica de la IL-6, con las consiguientes reacciones inflamatorias y la liberación simultánea de las hormonas mencionadas. Las observaciones anteriores parecen indicar que, en el curso de las infecciones graves, la IL-6 estimula la función que tiene la pituitaria anterior como una glándula moduladora de la inflamación <sup>(277)</sup>.

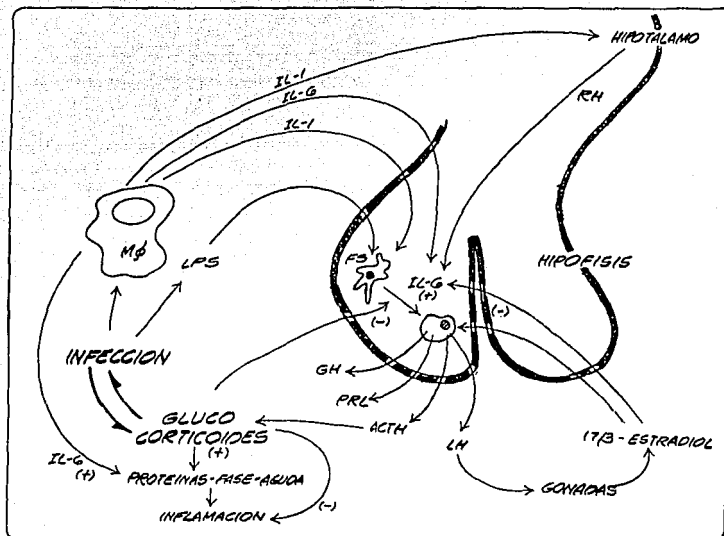
Se ha observado que, después de su inyección endovenosa en ratas, la IL-6 produce un incremento en los niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotrópica [ACTH]. Este efecto se puede apreciar en los 30 minutos que siguen a la inyección <sup>(200)</sup>. Otros experimentos realizados por Spangelo *et al* <sup>(276)</sup> revelan que el incremento en la producción de ACTH provocado por la inyección de IL-6 se efectúa a través de la estimulación del hipotálamo, en donde se produce la hormona liberadora de corticotropina, ya que en presencia de anticuerpos anti-hormona liberadora de corticotropina, inyectados 10 minutos antes de la IL-6, se puede observar que se anula la liberación de ACTH. Conviene recordar que esta última hormona actúa sobre la corteza suprarrenal, promoviendo la conversión del colesterol en pregnenolona, precursor de todas las hormonas esteroides <sup>(282)</sup>.

La relación entre la producción de la IL-6 y el sistema endócrino ha sido comprobada recientemente por los trabajos de Spangelo y sus colaboradores <sup>(274)</sup>, quienes

demonstraron que esta citocina es capaz de estimular la liberación de varias hormonas hipofisarias, las cuales pueden ser encontradas en el sobrenadante de un cultivo con las células dispersas de la pituitaria anterior de rata. La hipófisis no sólo resulta sensible a la IL-6 sino que, además, puede llevar a cabo la síntesis autócrina de la interleucina cuando es estimulada por diversas sustancias. La síntesis de la interleucina por las células de la hipófisis se presenta al incubarlas con 10 µg/ml de LPS bacterianos o con el diéster de forbol [PMA]. Por otra parte, en estas mismas células, las concentraciones picomolares de IL-6 inducen la liberación de las hormonas prolactina [PRL], del crecimiento [GH], luteinizante [LH] y folículo estimulante [FSH], lo cual ha permitido sugerir que la IL-6 circulante puede actuar en el control de la secreción hormonal de la porción anterior de la glándula pituitaria (274).

Vankelecom *et al* (325) observaron, también en 1989, que los cultivos de células de la pituitaria anterior de ratón o de rata son capaces de producir IL-6 y que la cantidad de interleucina liberada está en relación con la presencia y el número de estas células. Asimismo, ellos encontraron que la IL-6 es producida por las células folículo estrelladas [FS] de la hipófisis, aun en ausencia de estímulos intencionales. Las células folículo estrelladas [FS] representan uno de los varios tipos celulares que componen la porción anterior de la glándula pituitaria y, poseen ciertas características en común con las células fagocíticas mononucleares [MPC]. La producción de la IL-6 por las células FS es una actividad compartida con las MPC. Todas ellas producen IL-6 después de ser sembradas en un medio de cultivo. El grupo de Vankelecom (325) piensa que, *in vivo*, la producción de la IL-6 por las células FS puede ocurrir después de algún estímulo proveniente del hipotálamo o por los LPS contenidos en la sangre circulante de personas con infecciones.

Más recientemente, en 1990, Spangelo y sus colaboradores (277) comunicaron que, mantenidas en un medio de cultivo, las células de la pituitaria anterior secretan cantidades grandes de la IL-6 ( $2-4 \times 10^3$  U/ml en  $4 \times 10^5$  células) de una manera espontánea, entre 2 y 8 horas después de iniciado el cultivo. La producción de esta interleucina se incrementa al doble (10-100 nM) cuando las células son estimuladas con PMA y se eleva hasta cuatro veces si se añaden pequeñas cantidades (0.001-10.0 µg/ml) de LPS. También el tejido de la hemipituitaria, recién obtenido, secreta más de 3,000 U/ml de IL-6 a las 4 horas de incubación y, cuando las células se colocan en presencia de 10 µg/ml de LPS, la síntesis de la interleucina se triplica.



**Figura 19.** El esquema presenta algunas de las interacciones entre los sistemas neuroendócrino e inmunitario. La IL-6 actúa como un mediador que estimula la síntesis de proteínas de fase aguda, informa al hipotálamo sobre la reacción inflamatoria antiinfecciosa que ellas provocan y, al mismo tiempo, participa en la estimulación de la hipófisis que conduce a la liberación de glucocorticoides antiinflamatorios.

## 8. 2. 2. Mecanismos de la inducción de IL-6 en la hipófisis.

Al estudiar los mecanismos que participan en la inducción de la síntesis de la IL-6, en la hipófisis anterior, el mismo grupo de investigadores dirigidos por Spangelo <sup>(273)</sup> comprobó, en 1990 que, *in vitro*, el [(Bu)<sub>2</sub>-AMPC] (un análogo del AMPC), la PGE<sub>2</sub>, el forskolin (diterpeno activador de la adenilato ciclasa) y la toxina del cólera, son buenos inductores de la síntesis de la interleucina cuando se añaden a los cultivos de las células de la pituitaria anterior. El efecto obtenido depende de la cantidad utilizada de cada sustancia. Los resultados de estas investigaciones han revelado que, en las células mencionadas, se pueden alcanzar incrementos en la producción de IL-6 de hasta 27 veces el valor basal con la primera de las moléculas, 5 veces con la segunda, 3.5 veces con la tercera y de 3 a 12 veces con la última. En todos estos experimentos la concentración de la IL-6 fue cuantificada por un bioensayo, midiendo la tasa de proliferación de las células del hibridoma 7TD1, cuyo crecimiento resulta dependiente de IL-6. Todos estos compuestos y lo mismo la isobutilmetilxantina ya habían mostrado su efecto inductor del RNAm de la IL-6 en las células FS-4, según lo indicaron Zhang y colaboradores <sup>(349)</sup>, en 1988. En vista de los resultados, los últimos autores propusieron que las concentraciones intracitoplasmáticas de AMPC representaban un control importante en la síntesis de IL-6.

Adicionalmente, el equipo de Spangelo <sup>(273)</sup> encontró que, entre todos los péptidos hipotalámicos que estimulan la adenilato ciclasa, el péptido intestinal vasoactivo [VIP] es el único que induce, *in vitro*, la liberación de IL-6 por las células de la pituitaria anterior. Asimismo, ellos demostraron que al añadir el glucocorticoide sintético dexametasona al medio de cultivo, se inhibe la producción de IL-6 por las células de la pituitaria anterior y que este efecto depende de la concentración del esteroide. El resultado anterior coincide con el que había sido comunicado por Helfgott y colaboradores <sup>(90)</sup>, en 1987, utilizando la línea celular de fibroblastos FS-4, en la cual la dexametasona también inhibe la acumulación del RNAm para la IL-6.

En un estudio posterior, realizado nuevamente por el equipo de Spangelo y publicado en 1990 <sup>(276)</sup>, se demostró que la secreción de IL-6 podía ser estimulada mediante la preincubación de LPS con las células de la pituitaria anterior o del tejido proveniente del hipotálamo basal medio [MBH] de ratas macho y hembra. La producción basal de IL-6 fue aumentando con el tiempo y sus niveles fueron mayores en el primer caso. De una manera similar, el [(Bu)<sub>2</sub>-AMPC] también aumenta la cantidad

de RNAm para la IL-6 cuando es añadido a los cultivos de células del MBH o de la hemipituitaria.

Cuando son estimuladas con LPS, las porciones anterior y posterior de la pituitaria producen mayores cantidades de IL-6 que el tejido nervioso (hipotálamo). Los autores citados <sup>(276)</sup> han propuesto que la IL-6 puede actuar sobre las células de la pituitaria de una manera parácrina o autócrina y que, en los dos casos, provoca la liberación de varias hormonas hipofisarias.

Los resultados de los experimentos realizados por Carmeliet *et al* <sup>(33)</sup>, en 1991, revelaron nuevos aspectos de las relaciones entre la IL-6 y la hipófisis. Así, por ejemplo, la edad de los animales es un factor importante para la liberación de esta citocina por las células de la pituitaria. Ellos observaron que si los cultivos de las células de la hipófisis de las ratas provienen de animales entre 5 y 90 días de edad, la producción de IL-6 se incrementa paulatinamente desde 25 a 600 U/ml. Dicho incremento es más evidente en las ratas de 30 a 90 días de vida, y según los autores puede deberse a un aumento de las células que secretan IL-6, a una mayor capacidad de las células de la pituitaria para producirla, o para responder hacia los agentes liberadores de ella.

Además, cuando la dexametasona [DEX] se añade a esos cultivos, inhibe la liberación de IL-6 de una manera específica y dependiente de la dosis empleada. Así, 100 nM del glucocorticoide impiden la síntesis de la interleucina hasta en un 96-98%, aunque cuando la DEX se adiciona conjuntamente con inductores de IL-6, la inhibición que provoca no es tan acentuada. Ni el estradiol ni la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona tienen el mismo efecto inhibitorio.

Por todo lo anterior, este equipo de investigadores <sup>(33)</sup> señala que, en la pituitaria anterior, la liberación espontánea de IL-6 se encuentra modulada por la concentración de ACTH y glucocorticoides en la sangre circulante. Esta afirmación se apoya en la observación de que una región del promotor del gene de la IL-6 humana y la murina posee una secuencia de nucleótidos que es sensible a la presencia de glucocorticoides <sup>(296)</sup>. Carmeliet y colaboradores <sup>(33)</sup> sugieren que, *in vivo*, la liberación de ACTH (mediada por la IL-6) en la pituitaria anterior puede estar controlada a través de un mecanismo de retroalimentación en el cual intervienen los glucocorticoides. En ese mismo estudio, ellos observaron que el forskolin incrementa la liberación de IL-6 en los cultivos de agregados de células de la pituitaria anterior, aun en presencia de la dexametasona. Esta

observación es congruente con los resultados obtenidos por otros autores <sup>(230, 349)</sup> en favor de que el aumento en la concentración intracitoplasmática de AMPc es uno de los principales estímulos que, como segundos mensajeros, promueven la transcripción del gene de la IL-6 en fibroblastos. Aunque Carmeliet *et al* <sup>(33)</sup> no estudiaron cuál es la fuente de la IL-6 en los cultivos de agregados de células de la pituitaria anterior, ellos proponen que pueden ser las células folículo estrelladas o las células del mesénquima estimuladas por virus, por IL-1 o por poli I/C <sup>(325)</sup>.

Más recientemente, en 1991, Spangelo *et al* <sup>(275)</sup> investigaron la participación que tienen diversos inductores de la expresión del gene de la IL-6, en la liberación de dicha interleucina por las células de la pituitaria anterior. Este grupo de investigadores ha observado un incremento significativo en la secreción de IL-6 cuando la rIL-1 $\alpha$  y la rIL-1 $\beta$  se añaden a los cultivos de células de la pituitaria anterior, en concentraciones que van desde 0.04 hasta 25 ng/ml. A las 6 horas de incubación, este aumento puede ser de 3 a 5 veces y no se acompaña de cambios en las concentraciones del AMPc, intra o extracelularmente. Otros coinductores de la liberación de IL-6 en los cultivos referidos son el VIP, la PGE<sub>2</sub> y los LPS, los cuales incrementan la producción de la interleucina en una forma similar a las IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, sólo los dos primeros aumentan la concentración extracelular de AMPc, lo cual significa que, en las células de la pituitaria anterior, tanto las IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , como los LPS promueven la liberación de IL-6 mediante una vía distinta a la del AMPc. En cambio, cuando las células de la pituitaria anterior son pretratadas con PMA y luego se les añaden IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> o LPS, se observa que la secreción de IL-6 resulta cuantitativamente similar en todos estos casos. Como no se observa un incremento mayor de IL-6 en las células pretratadas con PMA y luego estimuladas con ella misma, queda demostrado que, la proteína cinasa C [PKC] no se encuentra involucrada en la liberación de IL-6, en las células de la pituitaria anterior.

Por otra parte, la secreción de IL-6, inducida por IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y LPS se reduce en los cultivos de las células de la hipófisis anterior que son pretratadas y cultivadas con dexametasona. De acuerdo a los resultados anteriores, estos autores <sup>(275)</sup> opinan que, *in vivo*, la liberación de IL-6, inducida por la IL-1 en las células de la pituitaria anterior, debe estar controlada por los glucocorticoides. De este modo puede quedar integrado un mecanismo de retroalimentación negativo que coincide con lo informado por Carmeliet *et al*, en 1989 <sup>(34)</sup>.

Spangelo y su grupo <sup>(275)</sup> sugieren que, posiblemente, las células encargadas de la síntesis de la IL-6 en la hipófisis anterior son las células FS, tal y como lo habían propuesto anteriormente Vankelecom *et al* <sup>(325)</sup>, en 1989. Sin embargo, los primeros autores <sup>(275)</sup> están a favor de que la inducción se lleva a cabo por medio de la IL-1 producida por los tirótrofos. Además, ellos proponen que las células productoras del VIP (lactótrofos) también pueden colaborar en la liberación de IL-6 en la pituitaria anterior.

Existe la posibilidad de que sean varios los mecanismos de acción de la IL-6 sobre las células productoras de hormonas. En favor de este punto de vista se encuentran las observaciones de que, *in vivo*, la administración de IL-6 a ratas adultas estimula la secreción de ACTH por la hipófisis, mediante la producción de la hormona liberadora de corticotropina [CRH]. Asimismo, la dopamina disminuye la liberación de PRL inducida por la IL-6, de modo que ella también puede ser uno de los mediadores de la transducción de la señal que transmite la IL-6 en la pituitaria anterior <sup>(274)</sup>.

### 8. 3. IL-6 y la glándula Timo.

El trabajo de Screpanti y colaboradores <sup>(254)</sup>, publicado en 1992, ha puesto de manifiesto, nuevamente, la capacidad de la IL-6 para actuar como un neuromodulador, sólo que, en este estudio, las actividades de la interleucina fueron investigadas en la glándula timo y no en el cerebro. Los resultados demostraron que dicha interleucina puede actuar de distintas formas sobre este órgano linfóide primario. En presencia de IL-6 o NGF, producidas de manera autócrina, cultivos de células no linfoides del estroma tímico, parecidas a las células nerviosas, mantuvieron su crecimiento y se diferenciaron, mostrando un fenotipo y marcadores bioquímicos específicos de las células nerviosas. Casi la totalidad de ellas expresó citoqueratina y, del 20 al 30% de las mismas, mostraron los antígenos de superficie A2B5 y Leu-7, relacionados con las células derivadas de las crestas nerviosas, así como los neurofilamentos de 68 y 160 kDa. En uno de los cultivos (TC-1S) también se identificó a la sinapsina I, una de las proteínas que se encuentra en las neuronas. Los mismos autores encontraron que, en estos cultivos celulares de timo murino, la expresión del gene de la IL-6 está bajo control del factor que estimula el crecimiento del tejido nervioso [NGF], puesto que los niveles de RNAm para la interleucina mencionada se incrementan 1 hora después de la adición de este factor y alcanzan su nivel máximo a las 24 horas de añadido. Por estos resultados y por la



actividad de la interleucina sobre la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T, los autores de este trabajo <sup>(254)</sup> creen que la IL-6 posee diversas actividades en el timo. Además de los resultados obtenidos con el NFG, la existencia en el timo de células derivadas de las crestas nerviosas, apoya la idea de que el desarrollo de ese órgano linfoide primario depende de los productos sintetizados por células que provienen de las crestas neurales, donde IL-6 actúa como neuromodulador.

#### 8. 4. IL-6 y endometrio.

En vista de que el endometrio contiene receptores para hormonas esteroides y de que, además, en este tejido existen agregados de células linfoides (macrófagos y linfocitos T, principalmente), algunos autores han propuesto la idea de que algunas citocinas, entre ellas IL-6, pueden estar involucradas en el control del ciclo menstrual.

Tabibzadeh *et al* <sup>(289)</sup>, en 1989, han encontrado otra relación entre el sistema inmunitario y el sistema endócrino. Ellos observaron que, *in vitro*, las células del estroma endometrial humano, recién explantadas y estimuladas por IL-1 $\alpha$  (la más potente inductora), IL-1 $\beta$ , TNF o IFN $\gamma$ , pueden producir varias isoformas de IL-6. Estas variedades de la interleucina están fosforiladas y tienen una movilidad electroforética en SDS-PAGE que fluctúa entre los 23 y los 30 kDa. Todas ellas son biológicamente activas y alcanzan su máximo de producción ( > 800 ng/ml de IL-6 ), después de 48-72 horas de haberse iniciado el cultivo. Otro hallazgo interesante de este grupo de investigadores consistió en la observación de que el estradiol influye en la síntesis de la IL-6. En los cultivos de células del estroma del endometrio, la producción de IL-6 que había sido inducida por la IL-1 $\alpha$  se inhibe hasta un 70-80% cuando las células reciben un pretratamiento durante 24 horas con la hormona esteroide 17 $\beta$ -estradiol, a concentraciones que estuvieron dentro de los límites fisiológicos (10<sup>-9</sup> M).

El trabajo de Tabibzadeh *et al* <sup>(289)</sup> menciona que, en humanos, la IL-6 puede inhibir el crecimiento de las células epiteliales y endoteliales, así como la proliferación del epitelio de la mucosa uterina. Chen *et al* <sup>(45)</sup>, en 1989, también han demostrado que la rIL-6 impide la proliferación de varias líneas de células epiteliales. Además, en otros estudios, se ha observado que, los niveles circulantes de IL-6 fluctúan durante el ciclo menstrual, alcanzando sus valores mínimos durante la primera mitad del ciclo y los valores máximos justo antes de la menstruación. Todas estas observaciones en relación a

la producción de la IL-6 en el endometrio, a la concentración sérica de la citocina durante el ciclo menstrual, al control de su síntesis por los esteroides y a la actividad de dicha interleucina sobre las células del tejido endometrial, han contribuido para apoyar la hipótesis de que la IL-6 participa en la homeostasis del endometrio humano, la cual había sido propuesta por Kohase *et al* <sup>(137, 138)</sup>.

## 8. 5. IL-6 y Placenta

En un apartado anterior se ha descrito que IL-6 tiene la propiedad de estimular la secreción de distintas hormonas de la pituitaria anterior. Sin embargo, esta actividad no parece circunscribirse exclusivamente a este tejido endócrino, extendiéndose también a la placenta, lo cual parece indicar que la citocina desarrolla una actividad importante durante el embarazo.

Nishino y colaboradores <sup>(208)</sup> han podido comprobar que las células endócrinas de la placenta humana (localizadas en el trofoblasto), producen IL-6 de manera constitutiva y que, asimismo, en la superficie de dichas células existen receptores para ella. De este modo, las células del trofoblasto serían un sitio más de producción y de acción de la IL-6. Los mismos autores han encontrado que la rhIL-6 induce la liberación de la hormona gonadotropina coriónica humana [hCG] cuando se añade a los cultivos de células de trofoblasto. El máximo de secreción se manifiesta a los 90 minutos del inicio del cultivo y es dependiente de la dosis de IL-6 adicionada. La liberación de la hormona se encuentra modulada por la expresión de los IL-6R presentes sobre la membrana de las células trofoblásticas. Este mecanismo de control es independiente del que existe para la hormona liberadora de gonadotropinas [GnRH] producida en el trofoblasto, que también induce la liberación de hCG. La GnRH de origen trofoblástico es, química e inmunológicamente, idéntica a la GnRH hipotalámica.

Como inductores de la secreción de hCG, la IL-6 y la GnRH actúan en una forma sinérgica aunque cada una de ellas estimula sus respectivos receptores. Los autores citados <sup>(208)</sup> sugieren que la IL-6 puede ser un factor de crecimiento indirecto para los trofoblastos, debido a que incrementa la liberación de hCG. A su vez, esta última hormona ha demostrado apoyar, *in vitro*, el crecimiento del citotrofoblasto. Además, como la IL-1 también estimula la secreción de hCG en líneas celulares de trofoblastos humanas, Nishino *et al* <sup>(208)</sup> piensan que este evento se encuentra mediado por la IL-6.

Asimismo, proponen que, la IL-6 y el IL-6R pudieran ser uno de los controles principales de la secreción de hCG en la placenta.

En un trabajo posterior, este mismo grupo de investigadores <sup>(171)</sup> estudiaron el efecto inductor de la IL-1 sobre la secreción de hCG, utilizando poblaciones mixtas de células del sinciotrofoblasto primario y del citotrofoblasto de placentas humanas. En estas células, ellos encuentran que la secreción de la hormona hCG, inducida por la IL-1, está mediada completamente por la IL-6 y el IL-6R, ya que el evento se bloquea si se añade el anticuerpo monoclonal PM1, que está específicamente dirigido contra los determinantes de la glucoproteína gp-80 de dicho receptor. En cambio, los anticuerpos PM1 no pueden bloquear la producción de hCG inducida por agonistas de la hormona GnRH.

Utilizando IL-1 recombinante (rIL-1), los mismos autores demostraron que las dos formas de la molécula,  $\alpha$  y  $\beta$ , también participan en la inducción de la hCG, aparentemente, porque son citocinas producidas por el trofoblasto, que actúan como inductores de la producción de IL-6. Por otra parte, la presencia de monocitos en los cultivos de trofoblastos provoca una disminución rápida en la producción de IL-6 y de hCG, sin modificar la viabilidad de las células, lo cual sugiere la existencia de algún mecanismo regulador que está basado en la interacción entre el trofoblasto y las células mononucleares periféricas, después que éstas últimas (probablemente linfocitos T) fueron estimulados por la rIL-1 $\alpha$ .

Los autores de este trabajo <sup>(171)</sup> señalan que desconocen el mecanismo por el cuál se produce la IL-1 en las células del trofoblasto. Ellos apoyan la idea de que la síntesis de IL-6 en el trofoblasto probablemente depende de la acción de la IL-1 sobre uno de los varios elementos regulatorios que se encuentran en el promotor del gene de la IL-6. De hecho, la producción de IL-6 se encuentra regulada por varios agentes que pueden actuar sobre el promotor de este gene <sup>(231)</sup>. El mismo grupo de investigadores <sup>(171)</sup> menciona que, la producción de IL-1 en células del trofoblasto puede estar estimulada por los niveles de esteroides gonadales, los cuales, a su vez, modulan la liberación de la GnRH de la placenta, conformando, de esta manera, un sistema regulatorio. Estos autores opinan que, probablemente, la señal de transducción generada por la unión de la IL-6 al IL-6R, sea la que propicie la liberación de la hCG.

## 8. 6. Otras actividades biológicas poco conocidas de la IL-6.

Adicionalmente a todas las actividades biológicas señaladas, se han publicado trabajos que mencionan varias más, las cuales se refieren brevemente a continuación, aunque son poco citadas en la literatura consultada.

1. El IFN $\beta$ 2 (IL-6) aumenta la expresión de los genes que codifican los antígenos de histocompatibilidad (176, 237).

2. La IL-6 es pirogénica, aumenta el apetito e interviene en el metabolismo de los alimentos (94, 113).

3. La IL-6 puede inhibir el desarrollo de la malaria en los estadios hepáticos del protozoario (222).

4. La migración de los linfocitos humanos es inducida *in vitro* por IL-3, IL-4 e IL-6 (11).

5. La supuesta actividad antiviral atribuida a la IL-6 por Weissenbach *et al* (338), en 1980, ha sido refutada por Hirano *et al* (101), en 1988.

## 9. Interleucina 6 y enfermedad

---

### 9.1. Desregulación de su expresión.

Algunos autores opinan que, probablemente, la producción no regulada de la IL-6 está relacionada con el desarrollo de tumores de células plasmáticas y con la aparición de otras enfermedades. Varios grupos de investigadores han observado que la concentración de la IL-6 en el suero se encuentra considerablemente elevada en el curso de distintas enfermedades proliferativas o autoinmunitarias, lo cual ha dado paso a la teoría de que un descontrol en la expresión del gene de dicha interleucina podría ser la causa fundamental de esos padecimientos. Además, otros autores, como Hirano y Kishimoto, han sugerido que la sobreproducción de IL-6 puede ser la causa de la activación policlonal de las células B, lo que, a su vez, genera la aparición de hipergammaglobulinemias o la síntesis de autoanticuerpos en pacientes con mixoma cardíaco o con la enfermedad de Castleman <sup>(99, 132, 330)</sup>.

Se ha encontrado que los ratones transgénicos a los que se les injertó el gene humano de la IL-6, conjugado con el promotor del gene de las cadenas pesadas de Ig humana (E $\mu$ -IL-6), desarrollan espontáneamente tumores de células plasmáticas o plasmocitomas <sup>(132)</sup>. Como se sabe que esta interleucina es un factor estimulante del crecimiento de células tumorales, mielomas y plasmocitomas, no se descarta su participación en la oncogénesis de esta clase de neoplasias malignas <sup>(129)</sup>.

Otras enfermedades proliferativas en las que se ha observado una producción elevada de IL-6 son la glomerulonefritis proliferativa del mesangio y el linfoma de células T de Lennert (un linfoma no Hodgkin) en el que se presenta una infiltración masiva del tejido linfoide por células semejantes a los macrófagos. En la primera de estas dos enfermedades se han encontrado niveles elevados de IL-6 en la orina de los pacientes,

siendo su fuente, probablemente, las mismas células del mesangio, ya que esta interleucina actúa como un factor de crecimiento autócrino para el mesangio del riñón de rata <sup>(111, 263)</sup>. Por otra parte, cabe mencionar que después de cualquier lesión tisular, incluyendo las ocasionadas por intervenciones quirúrgicas, se encuentran elevaciones significativas en la concentración sanguínea de la IL-6 <sup>(113)</sup>.

## 9. 2. IL-6 como inductor de mielomas y plasmocitomas.

A partir del conocimiento inicial, en 1987, de que la IL-6 posee una actividad estimuladora del crecimiento de los plasmocitomas <sup>(210)</sup>, otros investigadores han estudiado su posible participación en el desarrollo de los mielomas múltiples. Es bien conocido que los tumores, para ser autónomos, necesitan producir sus propios factores de crecimiento y receptores funcionales para ellos. Se ha observado, *in vitro*, que cuando los mielomas humanos secretan IL-6 y, al mismo tiempo, expresan receptores para ella, su proliferación espontánea se inhibe con anticuerpos anti-IL-6. Por esta razón se ha propuesto que la interleucina es un factor de crecimiento, autócrino, para las células de mieloma humano provenientes de la médula ósea <sup>(10, 129)</sup>.

Sin embargo, aunque las células del mieloma pueden producir esta interleucina, sólo responden a ella aquellas células que se obtienen en las etapas clínicas tempranas, en tanto que no responden a la IL-6 las células provenientes de pacientes que se encuentran en las etapas clínicas tardías de la enfermedad <sup>(10)</sup>. Las observaciones anteriores han permitido sugerir que la IL-6 ejerce una función esencial como factor de crecimiento autócrino y que, posiblemente, su relación con la oncogénesis de mielomas múltiples humanos se debe a un descontrol en la expresión de su gene. Además, se ha observado un aumento en la tumoricidad de los hibridomas y de los plasmocitomas murinos a los que se les ha transfectado el gene de la IL-6 <sup>(249)</sup>. Asimismo, debido a que la mitad de los pacientes con mieloma muestran como fuente principal de la IL-6 a la médula ósea, se ha pensado que esta citocina actúa de manera parácrina <sup>(135)</sup>. Sin embargo, los estudios de Levy *et al* <sup>(155)</sup>, en 1991, han mostrado que, en las líneas celulares de mieloma humano U-266 y RPMI-8226, la IL-6 secretada actúa de forma autócrina. Los cultivos de estas células proliferan en presencia de rIL-6 externa y la multiplicación celular no se inhibe al agregar anticuerpos anti-IL-6, aunque sí se detiene, hasta en un 80-90%, en presencia de los oligodesoxinucleótidos sintéticos anti-sentido y sin-sentido. Estos

resultados han servido de base para que el equipo de Levy <sup>(155)</sup>, proponga que puede ser interna la señal activante para el crecimiento de esos mielomas.

La IL-6 también parece estar involucrada en la oncogénesis de algunos plasmocitomas murinos, cuya inducción experimental con aceite mineral fue descrita en 1962 por Potter y Boyce <sup>(226)</sup>. El tejido granulomatoso que se forma en el peritoneo de los ratones Balb/c, después de la inyección de aceite mineral, también secreta grandes cantidades de IL-6. Por otra parte, la relación causal entre la IL-6 y la hipergammaglobulinemia parece haber quedado sustentada con el descubrimiento de que los ratones transgénicos, injertados con el gene humano de la IL-6 conjugado al promotor del gene humano de la cadena pesada de Ig, generalmente mueren después de presentar esplenomegalia con una infiltración masiva de células plasmáticas, un aumento dramático de los niveles de Ig y una glomerulonefritis proliferativa del mesangio <sup>(283)</sup>.

### 9. 3. IL-6 y la enfermedad de Castleman.

Otro padecimiento que presenta relación con los niveles elevados de IL-6 es la enfermedad de Castleman. Esta afección, parecida a los timomas, es una hiperplasia benigna y grande de los ganglios linfáticos del mediastino. Se caracteriza por fiebre, anemia, hipergammaglobulinemia y un incremento en la concentración sanguínea de las proteínas de fase aguda, en asociación con una hiperplasia benigna de los ganglios linfáticos <sup>(132)</sup>.

En los centros germinales de los ganglios linfáticos hiperplásicos se observa una infiltración masiva de células plasmáticas, que producen grandes cantidades de IL-6, de una manera constitutiva. En algunos pacientes se presenta una gammapatía monoclonal y, al final, un mieloma múltiple <sup>(348)</sup>. Si a los pacientes con la enfermedad de Castleman se les extirpan quirúrgicamente los ganglios hiperplásicos, se obtiene una mejoría clínica notable porque desaparecen los síntomas mencionados anteriormente y desciende la concentración de la IL-6 en el suero. Todo lo anterior le ha permitido a Kishimoto <sup>(132)</sup> proponer que la regulación anormal en la expresión del gene de esta interleucina pudiera ser el evento primario en la patogenia de esa rara enfermedad.

#### 9. 4. IL-6 y el linfoma de células T de Lennert.

Este linfoma es otro trastorno orgánico que, tanto *in vivo* como *in vitro*, también parece relacionar a la producción de grandes cantidades de IL-6 con el crecimiento de los tumores de células cancerosas. El linfoma de Lennert es una variante especial del linfoma no Hodgkin, que se distingue por una infiltración masiva del tejido linfoide por histiocitos epitelioides derivados de macrófagos.

Los estudios realizados *in vitro* han revelado que la IL-6 mantiene el crecimiento de una línea celular de linfoma T, proveniente de un paciente con linfoma de Lennert, la cual también puede crecer en presencia de macrófagos o de los factores solubles derivados de ellos. Además, el efecto de dicha interleucina sobre estas células cancerosas queda neutralizado completamente después de la adición de anticuerpos anti-IL-6 al medio de cultivo. Como en esta enfermedad hay una infiltración masiva del tejido linfoide por macrófagos y como la IL-6 apoya el crecimiento de las células del linfoma, se ha sugerido la participación de la citada interleucina en el desarrollo *in vivo* de los linfomas de Lennert (132, 263).

#### 9. 5. IL-6, activación policlonal de células B y enfermedades autoinmunitarias.

En vista de las múltiples actividades biológicas de la IL-6, se han realizado muchos otros estudios *in vitro* para tratar de conocer mejor las funciones que esta citocina lleva a cabo en los diversos tejidos donde su síntesis ha sido demostrada. Los resultados obtenidos han revelado que cuando algunos tumores liberan grandes cantidades de IL-6, de manera constitutiva, pueden provocar la producción de autoanticuerpos y el inicio de procesos autoinmunes, como la artritis reumatoide, en el caso del mixoma cardíaco, el cáncer cervical, los carcinomas de vejiga (103, 133).

Por otra parte, Akira *et al* (6), en 1990, sostienen que la persistencia de algunos virus dentro del cuerpo y su reactivación pueden ser la causa de que se presenten o se inicien fenómenos autoinmunes en los que, quizás, el NF-IL6 está activando el gene de la IL-6 o ciertos provirus.



## 9. 6. IL-6 y mixoma cardíaco.

El mixoma cardíaco es un tumor benigno del corazón, localizado intraatrialmente, cuya presencia se acompaña de la producción de autoanticuerpos y de fenómenos autoinmunes, los cuales se revierten al extirpar las células tumorales (132). Los experimentos llevados a cabo con cultivos de células de mixoma cardíaco han mostrado que dichas células secretan grandes cantidades de IL-6, de manera constitutiva, por lo que se piensa que, *in vivo*, son los niveles anormales de la citocina mencionada los que inducen la activación policlonal de los linfocitos B y la producción de autoanticuerpos (99, 132).

## 9. 7. IL-6 y artritis reumatoide.

La artritis reumatoide [RA] es una enfermedad autoinmune que se expresa principalmente por síntomas en las articulaciones, aunque también presenta muchas otras manifestaciones de carácter sistémico tales como la hipergammaglobulinemia y los niveles elevados de las proteínas de fase aguda. En esta enfermedad, un gran número de linfocitos B y de células plasmáticas infiltran el tejido sinovial de varias articulaciones, en donde producen el factor reumatoide, es decir, autoanticuerpos de la clase IgM que reaccionan específicamente con los determinantes antigénicos de las IgG. Las reacciones inflamatorias provocan una hiperplasia de la membrana sinovial, la cual se encuentra infiltrada, además, por células mononucleares y por linfocitos T activados. Se cree que los sinoviocitos también participan en estos eventos, ya que se encuentran en el sitio donde hay destrucción celular, liberando mediadores de la inflamación y del daño tisular, así como proteasas que también destruyen el tejido cartilaginoso.

La aparición de la artritis reumatoide ha sido atribuida a diversas causas y puede estar facilitada por varios factores. Entre los agentes etiológicos que han sido más estudiados destacan las infecciones por diversos virus. Para explicar las lesiones que provoca la cronicidad de las reacciones inflamatorias en las articulaciones y en varios otros tejidos han sido propuestos varios mecanismos de daño inmunológico. Las citocinas IL-1 y TNF $\alpha$ , entre otras, son dos de las moléculas orgánicas que han sido implicadas en la destrucción inflamatoria de las articulaciones en los pacientes con artritis reumatoide. Estas citocinas estimulan la síntesis de proteasas y de prostaglandinas en los sinoviocitos y, además, provocan una resorción del hueso al activar los osteoclastos (85).

La IL-6 es otra de las interleucinas que ha sido relacionada con las reacciones inflamatorias que caracterizan esta enfermedad, ya que puede ser producida constitutivamente tanto por las células del tejido sinovial como por los linfocitos T y B que lo infiltran. Adicionalmente, se ha observado que la IL-6 es un factor de crecimiento para los linfocitos B de pacientes con artritis reumatoide, que han sido transformados en linfoblastos por el EBV, lo cual, según opina Kishimoto <sup>(132)</sup>, pudiera explicar el número elevado de esta clase de células que están presentes en la citada enfermedad.

Desde el descubrimiento de las principales actividades de la IL-6, varios grupos de investigadores han tratado de confirmar su participación entre los mecanismos responsables de diferentes enfermedades degenerativas y autoinmunitarias. Hasta ahora, sólo algunos de los resultados obtenidos parecen apoyar este punto de vista. Varios autores están en favor de que, a causa de las diversas actividades biológicas que manifiesta la IL-6 sobre distintos tipos de células, la sobreproducción de ella puede explicar algunas de las principales manifestaciones, localizadas o generalizadas, de los pacientes con artritis reumatoide. Entre éstas se pueden mencionar la infiltración del tejido sinovial por células plasmáticas, la producción de autoanticuerpos y el aumento en la producción de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva [CRP] y la proteína A amiloide del suero [SAA] <sup>(132)</sup>.

Houssiau *et al* <sup>(117)</sup>, en 1988, propusieron que la IL-6 participa en el desarrollo de las lesiones articulares de enfermedades como la artritis reumatoide [RA] y la osteoartritis [OA]. Sus estudios demostraron que el líquido sinovial de pacientes con diversas artritis inflamatorias contenía grandes cantidades de esta interleucina, a diferencia del suero de la mayoría de los mismos pacientes en donde la concentración de la IL-6 no se elevaba. Sin embargo, una tercera parte de los pacientes con artritis reumatoide que fueron estudiados, presentó una correlación significativa entre la concentración en el suero de la IL-6 y varias proteínas de fase aguda como PCR,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida,  $\alpha$ 1-antitripsina, fibrinógeno y haptoglobina. Independientemente de los trabajos anteriores, el grupo de investigadores dirigidos por Guerne <sup>(85)</sup> también ha estudiado la participación de la IL-6 en la aparición de los síntomas locales y sistémicos de pacientes con distintas artropatías. Ellos han encontrado que, *in vitro* y en presencia de suero, los sinoviocitos obtenidos de pacientes liberan, de manera espontánea, grandes cantidades de IL-6 (5,200 U/ml = 42 ng rBSF-2), la cual resulta de una masa molecular muy parecida a la IL-6 secretada por

los monocitos y los fibroblastos de la piel. Al actuar sobre diferentes líneas celulares, esta interleucina es capaz de promover la síntesis de Ig, el crecimiento de hibridomas o plasmocitomas y la producción de proteínas de fase aguda. Las actividades anteriores, estimuladas por la IL-6, fueron inhibidas al añadir anticuerpos anti-BSF-2/IL-6 a los cultivos de cada línea celular. Asimismo, la producción de la citada interleucina también se estimuló por la adición al medio de cultivo de IL-1, TNF $\alpha$ , y linfotoxina [LT] o TNF $\beta$ . En los cultivos de sinoviocitos, la primera de estas citocinas es más potente, como inductora de la síntesis de IL-6, que la segunda y ésta última, a su vez, resultó ser mejor inductora que la LT. Los mismos autores <sup>(85)</sup> también observaron que la síntesis de IL-6 aumenta después de añadir pequeñas cantidades de LPS a los cultivos de células de la sinovial.

Los resultados obtenidos por el grupo de Guerne <sup>(85)</sup> indican que, *in vitro*, los sinoviocitos provenientes de pacientes con enfermedades inflamatorias como la RA y la espondilitis anquilosante, producen cantidades similares de IL-6/célula que los sinoviocitos de pacientes con enfermedades no inflamatorias como la osteoartritis [OA] y la necrosis avascular. Sin embargo, *in vivo* existen notables diferencias entre la concentración de esta interleucina en el líquido sinovial de pacientes con artropatías inflamatorias y no inflamatorias como la OA. Estas diferencias pueden ser una consecuencia de la activación *in vivo* de otras células que filtran la membrana sinovial inflamada, como lo son los monocitos activados. Guerne *et al* <sup>(85)</sup> mencionan que, otra fuente probable de esta citocina pueden ser los sinoviocitos infectados con citomegalovirus, que son uno de los muchos inductores de la síntesis de IL-6. Sin embargo, los autores mencionados creen que, en las enfermedades artríticas, los sinoviocitos son la fuente principal de IL-6, ya que este tipo de células constituyen uno de los principales tejidos de la articulación y, además, se encuentran ubicados directamente en el sitio de la destrucción de ésta.

Otros resultados de estos mismos investigadores indican que la síntesis de la IL-6 también puede ser inducida por los cristales de urato, pirofosfato e hidroxipatita, los cuales se encuentran asociados con artropatías inflamatorias. Este hecho pudiera explicar el aumento en la producción de dicha interleucina en estas enfermedades. Además, ellos señalan que la IL-6 producida en los sinoviocitos no contribuye a elevar la síntesis de colagenasa y PGE<sub>2</sub>, que han sido identificados como los principales efectores en la destrucción de la articulación, cuando esta es mediada por la IL-1 y el TNF. De todos modos, como la membrana sinovial de los pacientes con RA tiene un infiltrado

masivo de linfocitos B y células plasmáticas que producen inmunoglobulinas, entre las que se encuentra el factor reumatoide que, probablemente, contribuye al depósito focalizado de complejos inmunes y, además, como los sinoviocitos secretan grandes cantidades de IL-6, que es una interleucina estimulante de la producción de inmunoglobulinas, Guerne *et al* <sup>(85)</sup> consideran posible que esta interleucina participe de una manera importante en la aparición de los signos clínicos, locales y sistémicos, que están presentes en la artritis reumatoide.

En 1990, Nietfeld y colaboradores <sup>(205)</sup> informaron acerca de la probable actividad que desempeña la IL-6, inducida por la IL-1, en las lesiones inflamatorias de los pacientes con RA. Ellos mencionan que la primera de estas dos interleucinas parece ser necesaria para inhibir la síntesis de proteoglicano que es un componente esencial del cartílago. Sus estudios *in vitro*, en los que utilizaron cartílago de niños y adultos sanos, adultos con osteoartritis y adultos con artritis reumatoide, mostraron que ninguna de esas muestras produce IL-6 de manera espontánea. Sin embargo, la producción de esta interleucina se estimula en grandes cantidades (hasta 135 ng/ml), en presencia de rhIL-1 $\beta$ , rhIL-1 $\alpha$  o IL-1 natural, dependiendo de las cantidades de estas últimas citocinas añadidas al medio de cultivo. La adición de las IL-1 al medio también produjo una disminución de más del 25% en la síntesis de proteoglicano, la cual fue determinada por la incorporación de <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>. Esta reducción fue menor al añadir, a los cultivos de cartílago, suero de conejo anti-IL-6 al 10% y no se observó cuando se usó suero de cabra anti-IL-6 al 5%. Estos resultados indican que el principal inhibidor de la síntesis de proteoglicano es la IL-1 y que la IL-6 también lo hace, pero de manera más limitada. Además, estos autores <sup>(205)</sup> opinan que la IL-6 puede ser un intermediario en la inhibición de la síntesis del proteoglicano, cuando ésta es inducida por la IL-1.

Los niveles elevados de IL-6 encontrados en el sobrenadante de los cultivos de cartílago, son parecidos a los niveles de la misma interleucina encontrados, por los mismos autores, en el líquido sinovial de personas con RA muy activa. Swaak *et al* <sup>(285)</sup>, en 1988, también han considerado que los niveles de IL-6 del líquido sinovial de pacientes con RA se correlacionan con la actividad local de la enfermedad.

Por otra parte, Nietfeld *et al* <sup>(205)</sup> han propuesto que la IL-6 presente en el líquido sinovial de las personas con RA se genera, parcialmente, por la inducción de la IL-1 sobre los condrocitos del cartílago de la articulación, aunque no descartan la posibilidad de que la IL-6 también sea producida por las células adyacentes al tejido sinovial

inflamado. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no han aclarado por completo la participación de IL-6 en el curso de las reacciones inflamatorias que provocan las lesiones articulares de los pacientes con artritis reumatoide. Así por ejemplo, los estudios *in vitro* realizados por Seckinger y colaboradores <sup>(253)</sup>, en 1990, utilizando células sinoviales y cartílago articular, parecen descartar la posibilidad de que la IL-6 sea uno de los elementos responsables de la destrucción del cartílago.

Los resultados de dichos estudios han mostrado que la IL-6 no inhibe la síntesis del glucosaminoglucano [GAG] y tampoco interviene en la síntesis del ácido hialurónico, eventos de los que es responsable la IL-1. Además, Seckinger y colaboradores <sup>(253)</sup> sustentan esta idea en los resultados de un estudio, no publicado hasta ese momento y realizado por Hauptmann y Dayer, en el que se han comprobado que la IL-6 no estimula la producción de PGE<sub>2</sub> y de colagenasa. En base a todos estos datos, Seckinger *et al* <sup>(253)</sup> no creen que la IL-6 ejerza un efecto proponderante en la destrucción del tejido conectivo, al menos, mediante mecanismos que involucran la síntesis de GAG, colagenasa y PGE<sub>2</sub>. Sin embargo, consideran posible que IL-6 estimule algunos eventos proliferativos de la RA, pudiendo actuar, de una manera sinérgica con otras citocinas, sobre los condriocitos o los fibroblastos sinoviales.

### 9. 8. IL-6 y lupus eritematoso sistémico.

El lupus eritematoso sistémico [SLE] es otra enfermedad autoinmune donde se ha demostrado un aumento significativo en la producción de la IL-6. El SLE es una enfermedad que conduce al daño de múltiples órganos, debido a la destrucción celular, mediada por autoanticuerpos o complejos inmunes. Se caracteriza por una hiperactividad de las células B, junto con una hipergammaglobulinemia policlonal y antígeno-específica. Los pacientes con esta enfermedad presentan grandes cantidades de células B linfoblastoides en circulación que, probablemente, son estimuladas por otro tipo de células, diferentes a ellas <sup>(134)</sup>.

Existe una literatura médica abundante en favor de que la producción de autoanticuerpos y la subsecuente formación de complejos antígeno-anticuerpo solubles está relacionada con la nefritis que se presenta en el SLE <sup>(158)</sup>. De una manera similar, se han publicado numerosas teorías que tratan de explicar las causas y los mecanismos

por los cuales se inicia y se prolonga la producción de autoanticuerpos. Como ejemplo, a continuación se describen brevemente algunas de ellas.

En 1978 se demostró que, en este padecimiento, existían anomalías en las funciones de las células supresoras y una reducción importante de su número, lo cual hizo pensar que había una deficiencia en la síntesis de las citocinas que controlan la producción y el crecimiento de estas células. Recientemente, otros autores han observado que, en el SLE, los monocitos, las células T y las células parecidas a las NK son las que regulan la hiperactividad de las células B <sup>(159)</sup>. En otros estudios, *in vitro*, se ha podido observar que existen deficiencias en la producción y en la respuesta hacia citocinas como IL-1, IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  y, además, en la inducción y respuesta hacia otros factores de crecimiento y de diferenciación de células B, después de la estimulación externa con lectina /Ag de los linfocitos provenientes de pacientes con SLE.

Los estudios en modelos animales han planteado la posibilidad de que la hiperactividad de las células B en el SLE se deba a una hiperproducción de citocinas, secretadas por células distintas a los linfocitos B, tal como en el caso de los ratones MRL/lpr. En otro de estos modelos se ha propuesto que las células B pudieran tener un defecto intrínseco, como se sospecha con los ratones NZB/NZW <sup>(134)</sup>.

Desde hace varios años, se tienen indicios de que la IL-6 pudiera estar relacionada con este desorden inmunológico. En 1988, el equipo de Tanaka <sup>(297)</sup> observó que el sobrenadante de los cultivos de células B humanas provenientes de pacientes con SLE presentaba actividad de IL-6. Asimismo, Hirohata y Miyamoto <sup>(105)</sup>, en 1990, encontraron un incremento en los niveles de esta citocina en el SNC de pacientes con SLE. Otro hallazgo significativo fue que la IL-6 exógena aumentaba la producción espontánea de anticuerpos anti DNA de doble cadena [dsDNA] en los cultivos de linfocitos de pacientes con SLE <sup>(159)</sup>. Estos últimos autores habían informado en 1990 <sup>(159)</sup> que los linfocitos CD8<sup>(+)</sup>, provenientes de pacientes con SLE apoyaban, en vez de inhibir, la producción policlonal espontánea de IgG, y que actuaban de manera sinérgica, con las células CD4<sup>(+)</sup>, para producir anticuerpos. Igualmente, observaron que los co-cultivos de células B con monocitos, linfocitos T, o células no-T no-B contienen IgG policlonal. Los co-cultivos que contenían células T CD4<sup>(+)</sup> y monocitos fueron los únicos que produjeron anticuerpos anti dsDNA, y los co-cultivos que incluían células CD4<sup>(+)</sup> poseían actividad de IL-6. Al año siguiente, ellos descubrieron la presencia de

IL-6 e IL-1 en las células del mesangio renal y en las asas capilares glomerulares, en personas con SLE que padecían nefritis.

Más recientemente, en 1991, este mismo grupo de investigadores <sup>(158)</sup> ha realizado estudios *in vitro*, cuyos resultados apoyan la hipótesis de que la IL-6 pudiera ser un factor patogénico en este padecimiento. Ellos han encontrado que el suero de pacientes con SLE, en fase activa, posee niveles elevados de IL-6 los cuales se correlacionan con la actividad de la enfermedad. Además, observaron una mayor cantidad de RNAm para IL-6 que para IL-1, TNF $\alpha$  y  $\beta$ , IL-2 o IL-4, en las células monocíticas de sangre periférica [PBMC], sin estimular, recién extraídas de 11 personas con SLE. En este tipo de células, sólo los anticuerpos anti-IL-6 y los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  inhibieron parcialmente la síntesis de IL-6, mientras que los anticuerpos anti-IL-4 incrementaron la producción de ella al triple. Los mismos autores informan que, en varios pacientes con SLE, del 10% al 15% de los linfocitos y del 15% al 80% de los monocitos son las células productoras de la IL-6 la cual, a su vez, es la inductora de la producción espontánea *in vitro* de IgG. Al mismo tiempo encontraron que la producción de la inmunoglobulina se inhibe considerablemente si se adicionan anticuerpos anti-IL-6, o anti-IL-1 observándose, incluso, que actúan de manera sinérgica. Cabe señalar que la producción espontánea de IgG se restableció cuando se les añadió IL-6 exógena a los cultivos de PBMC que habían sido tratadas con anticuerpos anti-IL-6, o con anticuerpos anti-TNF $\alpha$ . Los autores de estos trabajos <sup>(158)</sup> piensan que la IL-6 encontrada en los sobrenadantes de los cultivos de PBMC, provenientes de pacientes con SLE, la producen principalmente los monocitos. Esta aseveración la fundamentan en los presentes resultados y en otros previos <sup>(159)</sup>, donde ellos ya habían observado que los linfocitos B no estimulados, obtenidos de personas con SLE, requerían de la presencia de linfocitos T y de monocitos, para restablecer óptimamente su producción espontánea de IgG. Asimismo, ellos <sup>(158)</sup> sostienen que la producción excesiva de IL-6 es la responsable de la hiperactividad de los linfocitos B en el SLE, aunque reconocen que podrían ser más de una las citocinas que se encuentran involucradas en la sobreproducción de IgG. Una de tales citocinas pudiera ser el TNF $\alpha$ , cuyos bajos niveles han sido vinculados a esta enfermedad. En el mismo caso se encontrarían la IL-1, que ha demostrado ser uno de los activadores de la hiperactividad de las células B, en este padecimiento <sup>(297)</sup>, o la IL-4, que según Te Velde *et al* <sup>(301)</sup>, inhibe la secreción de IL-6 en los monocitos.

Aunque no se sabe qué es lo que genera la producción elevada de la IL-6, en los pacientes con SLE, el equipo de Linker-Israeli <sup>(158)</sup> cree que los anticuerpos anti-

linfocitos, presentes en los pacientes con esta enfermedad, o los complejos inmunes Ag-Ac que formen, pudieran ser el estímulo para la producción *in vivo* de esta interleucina .

Por otra parte, los trabajos recientes de Klashman *et al* <sup>(134)</sup>, muestran que las células B linfoblastoides, provenientes de pacientes normales e inmunizados con el toxoide tetánico, requieren de la IL-6 y del factor soluble CD23, para poder producir grandes cantidades de IgG anti-toxoide tetánico, en el medio de cultivo. Este mismo grupo de investigadores comparó la respuesta que provoca la IL-6 y el CD23 en las células linfoblastoides normales, en células linfoblastoides de SLE (ambas inducidas con toxoide tetánico), o en células linfoblastoides de SLE inducidas endógenamente. Aquí, ellos encontraron que la IL-6 era necesaria en las tres clases de células linfoblastoides para la producción de anticuerpos IgG anti-toxoide tetánico [IgG-Tet], y que la presencia de la molécula CD23 en el medio está asociada a un incremento en la producción de los anticuerpos IgG, IgM e IgA, también inducidos por la IL-6, en las células mencionadas. Uno de sus primeros resultados fue que las células linfoblastoides sin estimular, obtenidas de personas con SLE, producen espontáneamente el Ac policlonal citado al cultivarlas en un medio libre de suero, tal y como otros autores ya lo habían informado. También comprobaron que los cultivos de estas células secretan grandes cantidades de IL-6 (38 ± 12.9 U/ml). Las subpoblaciones de células productoras de anticuerpos eran más grandes, en tamaño, que la mayoría de los linfocitos B circulantes. Además, casi todas las células linfoblastoides de personas con SLE mostraron el fenotipo CD19<sup>(+)</sup>, mientras que aquellas que fueron responsables de la producción de anticuerpos presentaron el fenotipo poco común CD20<sup>(-)</sup>.

En este mismo trabajo <sup>(134)</sup> se refiere que la administración de rIL-6 a los cultivos de células linfoblastoides de SLE, estimuladas y no estimuladas, casi no modificó los niveles basales de IgG-Tet. En otro experimento en el que se utilizaron este mismo tipo de células, la adición de un exceso de anticuerpos anti IL-6 ocasionó una disminución de esta inmunoglobulina policlonal en un 40%, lo cual fue restituido al agregar IL-6 recombinante. Sólo 7 sobrenadantes de células linfoblastoides de pacientes con SLE presentaron anticuerpos anti dsDNA, cuya producción fue inhibida por anticuerpos anti IL-6. De la misma forma, el sobrenadante del medio RPMI 8866 (el medio de cultivo que contiene una línea celular linfoblastoide B, transformada por el EVB y usada por los autores como fuente de CD23) también incrementó la producción de anticuerpos anti dsDNA. El efecto inductor de la IL-6 y el CD23 en la síntesis de estos autoanticuerpos,



o en la respuesta policlonal de las células linfoblastoides fue muy semejante en ambos casos.

Klashman y su equipo de investigadores (134) opinan que el exceso de IL-6 encontrada en el sobrenadante de los medios de cultivo utilizados en sus experimentos fue producida por los linfocitos B o se debe a una anomalía en su metabolismo. Los mismos autores consideran que otras fuentes de esta interleucina podrían ser los monocitos, las células NK o linfocitos T contaminantes. En este último caso, las células T CD4<sup>(+)</sup>/CD8<sup>(-)</sup> o células "doble negativas" que expresan receptores  $\alpha/\beta$ , se han encontrado en proporciones muy elevadas en pacientes con SLE, y se cree que son las que incrementan la producción de anticuerpos anti-DNA. Los ganglios linfáticos de animales con enfermedades autoinmunitarias también contienen células "doble negativas", las cuales se consideran como la fuente potencial de la elevada cantidad de citocinas sintetizadas en los ratones MRL/lpr.

### 9. 9. IL-6 y la glomerulonefritis proliferativa del mesangio.

La glomerulonefritis proliferativa del mesangio [PGN] es una enfermedad del riñón que, en su fase primaria, se puede manifestar como una nefropatía por depósito de complejos inmunes cuyos anticuerpos pueden ser IgA o IgM, principalmente. Desde el punto de vista histológico, la enfermedad se caracteriza por un notable incremento de las células del mesangio. Por esta razón se cree que en su patogenia intervienen algunos factores capaces de estimular el crecimiento de estas células .

El factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF-1], la IL-1 y los sobrenadantes del cultivo de macrófagos son algunos de los factores estimulantes, derivados del sistema inmunitario, que han sido propuestos como responsables de la expansión del mesangio glomerular. Sin embargo, en algunos estudios recientes se opina que más bien son los factores liberados por las mismas células del mesangio los que parecen estar involucrados en la patogénesis de la PGN.

El punto de vista anterior se pudo sostener cuando, en 1989, Horii *et al* (111) demostraron, en ratas, que la IL-6 podía ser sintetizada por las células del mesangio cuando éstas se cultivaban en un medio complementado con suero fetal de ternera [FCS],

ya sea en presencia o en ausencia de LPS. Los mismos autores también encontraron RNAm para la IL-6, tanto *in situ* como en los cultivos de las células mencionadas.

Al extender sus estudios, ellos pudieron observar que la rIL-6 promueve la proliferación *in vitro* de las células del mesangio de rata. De modo que, en vista de todos estos resultados, se pudo proponer que la interleucina podía ser un factor de crecimiento autócrino para las células del mesangio de las ratas. El efecto observado fue dependiente de la dosis y la proliferación de las células se observó cuando las concentraciones de la interleucina estaban entre los 2 y los 200 ng/ml .

Por otro lado, el mismo grupo de investigadores <sup>(111)</sup> demostró la presencia de cantidades significativamente elevadas de IL-6 (30 a 126 pg/ml) en la orina de 19 pacientes con glomerulonefritis proliferativa del mesangio [PGN], mientras que la misma citocina sólo fue encontrada en 2 de 27 personas con una nefropatía membranosa. La actividad de IL-6 en estas muestras se pudo inhibir con anticuerpos monoclonales [mAc] anti IL-6. De la misma manera, ellos también demostraron que existe una relación entre la cantidad de IL-6 presente en la orina y el estadio progresivo de la PGN, sugiriendo que éste podía ser útil para el diagnóstico diferencial y para vigilar el curso de la enfermedad. Aunque los autores <sup>(111)</sup> no explican por qué sólo el 50% de los pacientes con PGN presentan la IL-6 en orina, de todos modos ellos proponen que la tasa de síntesis de esta interleucina probablemente cambia en el curso de la enfermedad y que su producción descontrolada puede ser una causa del crecimiento patológico de las células del mesangio, en la PGN .

**TABLA XIII. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA DESREGULACION DE LA EXPRESION DEL GENE DE LA IL-6 <sup>(132)</sup>.**

---

**Linfomas,  
Plasmocitomas,  
Mielomas,  
Artritis reumatoide,  
Enfermedad de Castleman,  
Mixoma cardíaco,  
Glomerulonefritis proliferativa del mesangio.**

---

## 9. 10. IL-6 y la Diabetes Mellitus.

Desde hace dos décadas se conoce que la diabetes tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente [IDDM], es una enfermedad autoinmunitaria crónica. Hace apenas unos pocos años que se descubrió la participación de los linfocitos T y de las células NK en la destrucción de las células  $\beta$  de los acinos del páncreas de ratas propensas a la diabetes. También se pudo comprobar que es posible prevenir la aparición de la enfermedad si a los animales (ratas BB) se les administra sfilica o anticuerpos monoclonales con una especificidad dirigida contra los linfocitos T <sup>(124)</sup>. Como una conclusión de los trabajos anteriores, se propuso que las citocinas producidas por los macrófagos activados durante el proceso de insulinitis, eran las que generaban la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas de las ratas, en el curso de la IDDM, porque eran las responsables de la activación de los linfocitos T citotóxicos <sup>(272)</sup>.

Actualmente se acepta la idea de que la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans la llevan a cabo los linfocitos T después de ser estimulados por la acción de citocinas como el TNF $\alpha$ , la IL-1 y la IL-6. También existe la posibilidad de que, directamente, estas mismas sustancias solubles pueden dañar la estructura, el funcionamiento y la viabilidad de las células de los islotes del páncreas.

En favor de este último punto de vista están los estudios de Campbell *et al* <sup>(32)</sup>, quienes, en 1989, encontraron que en los islotes de Langerhans murinos y en las células del insulinoma RIN-m5F de rata se puede producir IL-6 y RNAm para ella, cuando a sus cultivos se les adicionan IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , o ambos. Una vez confirmada la producción de IL-6 en el páncreas, surgió otro hallazgo interesante al observar que, *in vitro*, la secreción de insulina se incrementa en los islotes al adicionarles rIL-6, lo cual fue confirmado por Sandler *et al* <sup>(246)</sup> un año después. Cabe señalar que, en 1989, Josefsen *et al* <sup>(126)</sup> habían propuesto que la IL-6 ejercía una acción moduladora, de manera endógena, en la estructura y la función de las células  $\beta$  del páncreas y que, en 1990, se conoció que los pacientes a los que recién se les había diagnosticado la IDDM poseían niveles séricos elevados de IL-1 $\beta$  y de TNF $\alpha$  <sup>(272)</sup>.

Los estudios que se realizaron a continuación revelaron que, en los cultivos de células de los islotes de Langerhans del páncreas de ratas, la IL-6, al igual que la IL-1 $\beta$ , es una citocina capaz de inhibir la secreción de insulina inducida por glucosa. Este efecto se presenta a las 24 horas de iniciado el cultivo, siendo dependiente de la dosis añadida.

Sin embargo, aunque ambas citocinas también mostraron una acción inhibitoria aditiva en la inducción de la insulina producida por estas células, los autores de este trabajo <sup>(272)</sup> no creen que la IL-6 medie los efectos citotóxicos de la IL-1 $\beta$  en la IDDM.

Más recientemente, Jiang y Woda <sup>(124)</sup>, en 1991, han observado, en ratas BB, la presencia de células mononucleares (presuntivamente macrófagos), infiltrando los islotes, las glándulas de secreción exócrina que los circundan, los ductos, los vasos y el intersticio del páncreas. Además, en estos tejidos ellos lograron demostrar la presencia de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Las células que sintetizaban las dos primeras de estas moléculas eran más abundantes que las que sólo producían la tercera. Este hallazgo representa otro punto de apoyo a la teoría de que las citocinas son un factor importante en la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas.

## 9. 11. Infecciones e IL-6.

### 9. 11. 1. Infecciones bacterianas.

Un hecho conocido que ya ha sido mencionado varias veces en los capítulos anteriores, es la actividad biológica de los LPS o endotoxinas de las bacterias Gram negativas como uno de los inductores más potentes de la expresión del gene de la IL-6 en los cultivos de fibroblastos y monocitos o macrófagos humanos <sup>(90)</sup>. Para investigar la producción de esta interleucina *in vivo*, el mismo grupo de investigadores de Helfgott <sup>(90)</sup> cuantificó sus niveles en diversos fluidos biológicos obtenidos de pacientes con infecciones bacterianas agudas.

Los resultados de ese y otros estudios realizados por el mismo grupo de investigadores <sup>(91)</sup>, publicados en 1989, han revelado que, en las infecciones locales por Gram positivos y Gram negativos, hay una secreción elevada de diversos isotipos de IL-6, con PM que fluctúan entre 23 y 30 kDa y de 60 a 70 kDa, en diferentes fluidos corporales. Así por ejemplo, cuatro personas con meningitis bacteriana aguda, causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (dos casos), alcanzaron más de 500 ng/ml de IL-6 en el líquido cerebroespinal <sup>(91)</sup>. Los autores de este estudio también encontraron que la IL-6 en el suero tenía una concentración de 5 a 70 ng/ml en tres personas con bacteremia por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria meningitidis*. En otras personas con meningitis y

bacteremia, los niveles de IL-6 en el suero fueron 10 a 100 veces mayores que en estos últimos tres casos. Además, el líquido sinovial del tobillo de un paciente con artritis piógena causada por *Streptococcus canus* contenía 190 ng/ml de IL-6. Los resultados anteriores, han conducido a proponer que la producción de IL-6 se puede elevar como un resultado de infecciones bacterianas y que esto puede ser una respuesta local o sistémica, generalmente inducida por los LPS que contienen las bacterias <sup>(51, 91)</sup>. Este último grupo también ha propuesto a la IL-6 como uno de los elementos que participan en la respuesta de la mucosa hacia las infecciones por bacterias Gram negativas, vivas o muertas.

Por otra parte, el grupo de Van Damme <sup>(320)</sup> ya había sugerido, en 1989, que no sólo las células inmunocompetentes participan en la respuesta del organismo hacia las infecciones virales o bacterianas, sino que también lo hacen y de una manera importante, otras células accesorias que no pertenecen al sistema inmunitario, como los fibroblastos y las células endoteliales o los queratinocitos <sup>(84)</sup>. Ellos <sup>(320)</sup> sugieren esta idea porque han observado la producción simultánea de IL-6, IFN $\beta$  y una actividad estimulante de colonias de granulocito/macrófago [GM-CSA] en células humanas y animales que son estimuladas *in vitro* con IL-1, poli rI/rC, virus infecciosos (como el del sarampión y la rubéola) o virus de laboratorio (*Sendai*, *Mengo* y *Newcastle*). Las tres citocinas se sintetizaron en los fibroblastos en una forma dependiente de las dosis utilizadas de virus, *Escherichia coli* o poli rI/rC. Los virus infecciosos fueron los que más indujeron la síntesis de IL-6 (por arriba de 20,000 U/ml) en los fibroblastos humanos. Estos valores son similares a los encontrados en pacientes con infecciones virales agudas del SCN <sup>(66, 115)</sup>. En estos casos, la IL-6 inducida se neutralizó con anticuerpos anti-hIL-6.

En 1989, Van der Meer y su equipo <sup>(323)</sup> informaron que la IL-6 inyectada a ratones con una granulocitopenia experimental les proporcionaba un efecto protector muy leve contra la infección letal por *Pseudomonas aeruginosa*, aun administrando dosis altas de la interleucina (800 ng).

De Man *et al* <sup>(51)</sup> informaron, durante ese mismo año, varios datos importantes referentes a la cinética de producción de la IL-6 en el tejido de la mucosa. Ellos observaron que los ratones C3H/HeN presentaron aumentos en la concentración de IL-6, más rápidamente y en mayor cantidad en la orina que en el suero (> 1,000 U/ml versus 78 U/ml). Además, observaron que cuando los niveles de la interleucina en el suero permanecen elevados, sus niveles en orina se encuentran bajos, después de ser infectados con *Escherichia coli*, local o sistémicamente. Los niveles de la IL-6 producida por estos

ratones, después de la infección, mostraron una relación con el número de bacterias presentes en la vejiga y en los riñones, así como con el grado de infección, formando parte de la respuesta inflamatoria. Los ratones C3H/HeJ (una cepa que no produce IL-6 cuando los animales son estimulados con LPS) sólo la sintetizaron como un resultado del daño tisular (en el momento de la cateterización), aunque en mucho menor cantidad que los ratones de la primera cepa.

En vista de que los LPS bacterianos son los responsables de los cambios *in vivo* en los niveles que tienen en el suero ciertas citocinas como IL-1, TNF $\alpha$  e IL-6 y, de que la segunda de ellas es uno de los mediadores del shock bacterémico fatal, tanto en el hombre como en los animales, Starnes *et al* <sup>(280)</sup>, en 1990, utilizaron un modelo animal de shock séptico con la finalidad de investigar los efectos del bloqueo de la IL-6 en las infecciones agudas por *Escherichia coli*, basándose en el hecho de que dicha interleucina es un mediador importante que participa en la respuesta inflamatoria contra las infecciones <sup>(31, 64, 130)</sup>. El equipo de investigadores de Starnes <sup>(280)</sup> encontró que la administración previa del anticuerpo de rata anti IL-6 evita la muerte de los ratones que reciben la inyección endovenosa de una dosis letal de *Escherichia coli* o de TNF $\alpha$ . Ellos opinan que el TNF es un control positivo de la IL-6 *in vivo*, debido a que el pretratamiento de los ratones con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  disminuye notablemente (70%) los niveles de la interleucina en el suero. Todos estos datos vienen a confirmar los resultados de trabajos anteriores <sup>(64)</sup>, realizados en mandriles, en los cuales se había podido comprobar que los animales presentaban una reducción en la producción de la IL-6 después de la administración de anticuerpos anti-TNF $\alpha$ . Starnes *et al* <sup>(280)</sup> también observaron, *in vivo*, que los mAc anti-rmIL-6 aumentan la inducción del TNF $\alpha$  en animales inyectados con *Escherichia coli*. Este resultado es congruente con otros trabajos <sup>(3, 250, 262)</sup> en los que se informa que la administración de IL-6 reduce la producción de TNF $\alpha$  inducida por LPS, tanto *in vitro* como *in vivo*. De acuerdo a todos estos resultados, el equipo de Starnes <sup>(280)</sup> sostiene la hipótesis de que la IL-6 puede ser, además, uno de los factores responsables de los efectos letales que se presentan durante las infecciones, participando así en la patofisiología de éstas. Por ello proponen <sup>(280)</sup> que en la terapéutica de las infecciones se utilicen tratamientos con sustancias que impidan la expresión de la IL-6 o que bloqueen la unión con su receptor, así como sustancias antagónicas a dicha interleucina, particularmente en los casos de las personas que se encuentren en alto riesgo de padecer infecciones graves.

En un estudio llevado a cabo por Deviere *et al* <sup>(52)</sup>, en 1991, se encontró que, en tres pacientes con cirrosis hepática alcohólica que presentan complicaciones por infecciones con *Escherichia coli* y en otro caso infectado por *Streptococcus faecalis*, los niveles de IL-6 y de TNF $\alpha$  se encontraban elevados en el líquido de ascitis. Los valores de esas dos citocinas en el suero estaban ligera e inconsistentemente elevados. Sin embargo, se observó que después de administrar la antibióticoterapia regresaron a sus niveles normales. En base a estos resultados, los autores sugirieron que la cuantificación de ambas citocinas, en el líquido de ascitis, puede ser un procedimiento de laboratorio útil para confirmar el diagnóstico de la infección y para controlar la evolución de pacientes con una peritonitis bacteriana espontánea. Cabe mencionar que Deviere *et al* <sup>(53)</sup>, en 1989, ya habían encontrado niveles elevados de esta interleucina en personas con cirrosis.

En relación a la producción de IL-6 en el caso de infecciones por microorganismos Gram positivos, Havell y Sehgal <sup>(89)</sup> han observado que las inyecciones endovenosas de dosis letales y subletales de *Listeria monocytogenes* inducen la producción de IL-6, INF  $\alpha/\beta$  y TNF en el bazo de ratones sanos; mientras que en el suero de los animales sólo se encontraron las dos primeras citocinas. La inducción de la síntesis de IL-6 depende del número de bacterias presentes en el bazo y se produce, preferentemente, de una manera independiente de la producción del TNF, ya que en aquellos ratones a los cuales se les administraron simultáneamente anticuerpos anti-TNF se observó un incremento progresivo en los niveles de IL-6, el cual se mantuvo hasta la muerte de los animales. Estos resultados fueron consistentes con los que habían sido informados anteriormente por Jablons *et al* <sup>(122)</sup>, quienes encontraron que la inyección de TNF aumenta los niveles de la IL-6 en la sangre. Los resultados anteriores <sup>(89)</sup> también concuerdan con los de otros trabajos que refieren una elevación en la concentración de IL-6 en casos de toxemia experimental inducida en humanos <sup>(63)</sup> y en pacientes con infecciones <sup>(91)</sup>.

Un aspecto interesante de la actividad biológica de la IL-6 en el curso de las infecciones ha sido comentado por Shiratsuchi *et al* <sup>(265)</sup>, quienes en 1991 encontraron que las citocinas podían ejercer un doble efecto durante el establecimiento de las infecciones por *Mycobacterium avium*. En sus estudios, realizados *in vitro*, observaron que la IL-6, la IL-3, la IL-1 $\alpha$  y el M-CSF favorecen el crecimiento intracelular de *Mycobacterium avium* 86m2096 (una cepa relativamente avirulenta que ha sido relacionada con las infecciones por el HIV) en los monocitos humanos. En el caso de la primera de las cuatro citocinas, el efecto sobre el crecimiento intracelular del *Mycobacterium avium* fue

dependiente de la dosis. Además, la rIL-6 y la rIL-1 $\alpha$  también indujeron el crecimiento de ésta bacteria en los cultivos de tejidos desprovistos de monocitos.

### 9. 11. 2. Infecciones virales e IL-6.

Desde hace tiempo se conoce que, en algunas infecciones virales persistentes, la producción prolongada de anticuerpos contra los antígenos de los microorganismos provoca el desarrollo de una enfermedad por complejos inmunes. Estas infecciones experimentales, como es el caso de la coriomeningitis linfocítica de los ratones, generalmente se encuentran acompañadas de una invasión viral de las células T y B y de varios tejidos como el cerebro y otros órganos no linfoides <sup>(193)</sup>.

Algunas células infectadas crónicamente por virus promueven la síntesis y la secreción de diversas citocinas, entre las que se encuentra la IL-6. Un ejemplo de ello lo constituyen los linfocitos B que han sido infectadas por el EBV, los cuales producen IL-6 y expresan receptores de superficie para esta citocina, de modo que se puede decir que la infección es un evento que promueve el crecimiento autócrino de esas células <sup>(290, 305)</sup>.

En experimentos realizados con ratones se ha observado que la respuesta inmunológica no siempre es la misma cuando los animales son infectados con un solo tipo de virus. De esta forma, las citocinas que se producen, el tipo de células inmunocompetentes que infiltran el tejido infectado y su localización varían según las cepas de los animales utilizados y el tipo de infección viral inducida en ellos. Un estudio realizado recientemente por Moskophidis *et al* <sup>(193)</sup> contiene resultados que son un ejemplo de lo anterior. Estos autores demostraron que los ratones NMRI, infectados de una manera persistente con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) producen cantidades significativamente elevadas de IL-6 en el líquido cerebroespinal [CSF] y, en cambio, cantidades reducidas de la misma interleucina en el suero. Además, se comprobó la síntesis de todos los isotipos de IgM, IgG e IgA específicas para el virus y una infiltración importante de los tejidos del animal por linfocitos T CD4<sup>(+)</sup>, linfocitos B, células plasmáticas, macrófagos y algunas células CD8<sup>(+)</sup>, la mayoría de ellas activadas y localizadas principalmente en los espacios subaracnoideos y en los riñones. Al utilizar ratones CBA/J y provocarles la misma infección intracerebral con el LCMV, las meninges y el plexo coroides están infiltrados con células CD8<sup>(+)</sup> y monocitos. Sin embargo, los animales de esta cepa producen grandes cantidades de IL-6 e INF $\gamma$  tanto en



el CSF como en el suero. Aparentemente, en el curso de las infecciones experimentales causadas por el LCMV, el origen de las citocinas son los linfocitos T, los macrófagos de las meninges, las células de la microglia y los astrocitos, tal como había sido propuesto previamente por Frei *et al* <sup>(67)</sup>.

### 9. 11. 3. IL-6 y el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida [SIDA].

La infección con el HIV y el SIDA que se desarrolla posteriormente presentan como característica una activación policlonal de las células B, hipergammaglobulinemia, un incremento en el número de células secretoras de Ig, presencia de autoanticuerpos, una disminución en las respuestas específicas hacia antígenos y mitógenos, así como una incidencia elevada de linfomas de células B <sup>(28)</sup>. Debido a que está bien definida la función de la IL-6 en la diferenciación de los linfocitos B, se piensa que la producción no controlada y constitutiva de esta interleucina puede ser la causa de la activación policlonal de las células B, dando como resultado la hipergammaglobulinemia y la producción de autoanticuerpos en pacientes con ciertos tumores <sup>(99)</sup>. Por esta razón, existe la idea de que la IL-6 también se encuentra involucrada en algunas de las manifestaciones clínicas de los pacientes con SIDA o infectados con el HIV, tal y como ha sido informado por diversos grupos de investigadores. En apoyo al punto de vista anterior se pueden tomar los resultados de trabajos publicados por Gallo *et al* <sup>(72)</sup> quienes han encontrado IL-6 en el fluido cerebroespinal de 16 pacientes infectados con el HIV. Por otra parte, otros autores <sup>(6, 72, 106)</sup> refieren que los cultivos de monocitos expuestos al HIV incrementan su producción de IL-6 y que el NF-IL6 se une al promotor del HIV .

En 1989, Nakajima *et al* <sup>(201)</sup> informaron que, *in vitro*, las células mononucleares de sangre periférica [PBMC], principalmente los monocitos de donadores sanos, que son expuestas al HIV (vivo o inactivado) y al HIV no infeccioso (capaz de inducir la expresión del gene de la IL-6), producen RNAm para la IL-6 y secretan esta interleucina.

Un año después, el grupo de Breen <sup>(28)</sup> evaluó la producción de IL-6 en personas infectadas con HIV, bien sea que solo expresaran el complejo relacionado al SIDA [ARC] o que se tratara de pacientes con el SIDA. Ellos encontraron niveles altos de IL-6 (de 1.3 a 18 U/ml) y de CRP (44 mg/l) en el plasma de todos los pacientes infectados por el HIV. También observaron que, en las células mononucleares de la sangre periférica [PBMC] recién aisladas y sin estimular de dichos pacientes, habían niveles

elevados de RNAm para IL-6, los cuales se correlacionaron bien con los valores de la misma interleucina en el suero, previamente cuantificados. Estas mismas células también presentaron un aumento en la producción espontánea de anticuerpos de la clase IgG. Los cultivos de PBMC de los pacientes infectados con el HIV secretaron cantidades altas de IL-6, siendo los monocitos los principales productores de la interleucina. Los incrementos en la concentración de IL-6 en el suero de los pacientes alcanzaron a ser hasta 16 veces los valores de la misma encontrados en pacientes no infectados y personas normales, y no estuvieron relacionados al estado clínico de la enfermedad o a la coexistencia de infecciones. De acuerdo a estos resultados, los autores citados <sup>(28)</sup> sostienen la opinión de que la IL-6 es, probablemente, la responsable de la secreción policlonal de Ig en los pacientes infectados con el HIV. Además, ellos mismos creen que esta interleucina puede estar involucrada en la patogenia del cuadro clínico que presentan las personas infectadas con este virus y que el HIV induce la producción de cantidades elevadas de IL-6 *in vivo*.

En otros estudios publicados también en 1989, Oxholm *et al* <sup>(218)</sup> encontraron actividad de TNF $\alpha$  e IL-6 en las biopsias de piel, provenientes de pacientes con SIDA y con sarcoma de Kaposi [KS]. Esta neoplasia es una lesión vascular multifocal que generalmente complica la infección por el HIV, aunque también puede presentarse en otros estados de inmunosupresión como en pacientes a los que se les han practicado trasplantes renales o cardíacos. Los resultados anteriores <sup>(218)</sup> se correlacionan con la observación de que las líneas celulares derivadas del sarcoma de Kaposi obtenido de pacientes con SIDA, producen varias citocinas y factores de crecimiento <sup>(186)</sup>.

Como el HIV incrementa la producción de la IL-6 en los monocitos <sup>(201)</sup>, Miles y colaboradores <sup>(186)</sup> decidieron estudiar la producción y la respuesta hacia dicha interleucina, tanto en líneas celulares como en el tejido tumoral del sarcoma de Kaposi, provenientes de pacientes con SIDA. Utilizando las líneas celulares NS21J y EKS3, ellos demostraron la presencia de mRNA para la IL-6 así como para el IL-6R. Además, las dos líneas celulares mencionadas secretan grandes cantidades de esta IL y expresan el receptor para ella, siendo ambas moléculas biológicamente activas. El tejido circundante recién aislado de una lesión de sarcoma de Kaposi también mostró la presencia de IL-6 y del IL-6R, aunque en menores cantidades que el tejido comprometido por este tipo de lesión.

Estudios adicionales revelaron que la rhIL-6 también estimula la proliferación de estas líneas celulares y que la tasa de multiplicaciones de las mismas se encuentran disminuidas cuando al medio de cultivo, que contiene la línea celular EKS3, se añaden anticuerpos anti IL-6 o un oligonucleótido antisentido de IL-6. La adición de este último oligonucleótido sintético al medio de cultivo también provocó una disminución en la síntesis de IL-6 por dichas células. Sin embargo, la proliferación se restituyó al adicionarles hrIL-6. Al tomar en cuenta estos resultados, Miles *et al* <sup>(186)</sup> han manifestado que la IL-6 pudiera ser un factor de crecimiento autócrino para las células del sarcoma de Kaposi y que su producción puede estar inducida por citocinas o por las células epiteliales infectadas con virus entre los que se encuentran el HIV y el citomegalovirus <sup>(28, 258)</sup> .

El grupo de Honda <sup>(110)</sup>, en 1990, ha utilizado una técnica más sensible (luminiscencia de ELISA en sandwich) para medir los niveles de la IL-6 en el suero de pacientes infectados con el HIV y sus resultados mostraron aumentos mucho mayores a los que habían sido informados por otros autores. Así por ejemplo, las personas HIV seropositivos y asintomáticas tenían valores de IL-6 casi quintuplicados, en relación con las personas sanas, en las cuales la interleucina tenía una concentración sérica de 9.5 pg/ml. Aquellos pacientes infectados por el HIV que presentaban el complejo asociado al SIDA [ARC] alcanzaron cantidades de IL-6 casi 12 veces mayores que las de los individuos normales, mientras que en los enfermos con el SIDA los valores de la interleucina llegaron a sobrepasar casi 30 veces los niveles de la población sana. Además, todos estos valores se correlacionaban perfectamente con el grado de progreso de la enfermedad.

Los estudios anteriores fueron complementados con otras pruebas, realizadas *in vitro* en los diferentes grupos de personas infectadas con el HIV, las cuales revelaron que existe una relación significativa entre los niveles de IL-6 y los del receptor soluble para la IL-2 (sIL-2R). La cantidad de sIL-2R en el medio se duplica si al cultivo se añade IL-6 y disminuye en forma considerable al agregar mAc anti-IL-6 a las PBMC activadas con PHA e infectadas, posteriormente, con el HIV. Cabe señalar que este mismo equipo de investigadores había encontrado anteriormente una relación significativa entre los niveles de sIL-2R y el grado de enfermedad en las personas infectadas por el HIV. Los autores de este trabajo <sup>(110)</sup> apoyan la hipótesis de que los fagocitos mononucleares y las células T infectadas por el HIV podrían ser las productoras de la IL-6 circulante, la cual, a su vez, estimula a los linfocitos B para que produzcan grandes cantidades de Ig en una forma

poli-clonal. Ellos <sup>(110)</sup> piensan que los niveles altos de IL-6 deben ser un hallazgo común en las enfermedades que tienen una patogénesis inmune, puesto que ya se han encontrado niveles elevados de dicha interleucina en pacientes con tuberculosis, en mielopatías asociadas al virus linfotrófico de células T humanas y en las leucemias de células T de personas adultas.

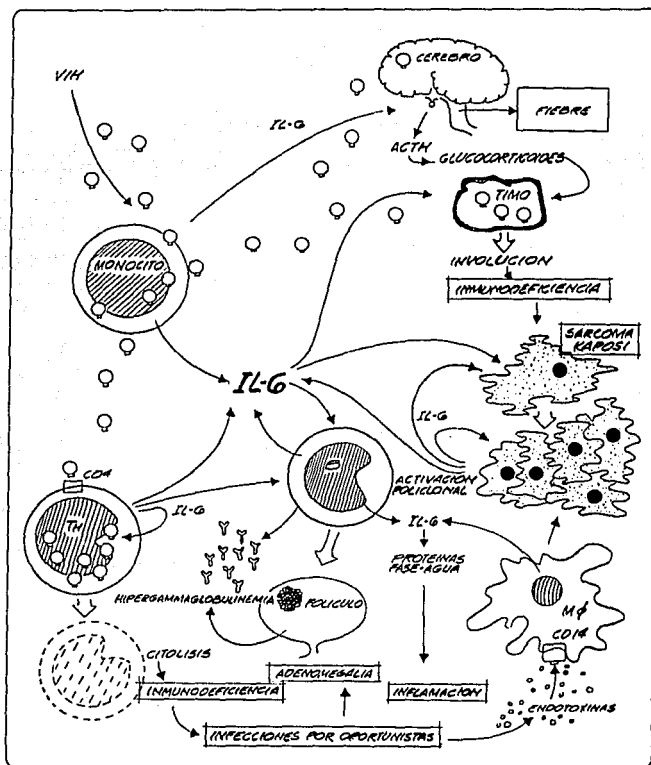


Figura 20. Representación esquemática de algunas de las principales actividades biológicas de la IL-6 en el organismo de una persona infectada con el HIV.

Más recientemente, en 1991, los trabajos de Amadori *et al* <sup>(7)</sup> han estado dirigidos al estudio de los procesos que producen la activación específica e intensa de los linfocitos B de sangre periférica, en pacientes infectados con el HIV-1. Sus estudios, realizados *in vitro*, parecen confirmar que, en las personas infectadas con el HIV, los monocitos y la IL-6 tienen una participación importante como factores responsables del aumento en la producción de anticuerpos. En los cultivos de células mononucleares de la sangre periférica [PBMC] de dichos pacientes se pudo observar que, después de extraer las células accesorias, ocurría una disminución importante en la síntesis espontánea de anticuerpos anti-HIV y en la producción total de Ig. Ambos efectos se pudieron restituir al agregarle rIL-6 al medio de cultivo. Además, la adición de anticuerpos anti-IL-6 a los cultivos de PBMC no fraccionados, inhibió la producción de anticuerpos anti-HIV-1, en una forma dependiente de la dosis. Los niveles séricos y la producción *in vitro* de IL-6 por las PBMC, no fraccionadas, ya sea estimuladas con LPS o no, fue muy similar tanto en las personas sanas como en aquellas seropositivas para el HIV (drogadictos) que se encontraban en diferentes estadios de la enfermedad.

De acuerdo a los resultados anteriores, Amadori *et al* <sup>(7)</sup> piensan que la IL-6 es un factor importante en la desregulación de los linfocitos B, observada en el curso de la infección por el HIV. Además, ellos señalan que no hay que perder de vista lo anterior, puesto que en estudios de otros investigadores se ha observado que las células B activadas producen grandes cantidades de IL-6 y de TNF $\alpha$ , las cuales son citocinas que aumentan la expresión y la replicación del HIV en las líneas celulares infectadas crónicamente <sup>(225)</sup>.

En ese mismo año de 1991, Schnittman y colaboradores <sup>(251)</sup> informaron otros resultados muy interesantes que aportaron fundamentos a una teoría que trata de explicar la disminución de las células T, observada en la infección por el HIV. Cabe señalar que la infección por este virus produce, en los humanos, la disminución de la población y las funciones de los linfocitos T CD4<sup>(+)</sup>, por efecto citopático y muerte celular. El trabajo de Schnittman *et al* <sup>(251)</sup> apoya la idea de que los cambios en el microambiente del timo pueden alterar el desarrollo de los timocitos durante la infección por el HIV. Este grupo de investigadores se basó en las sugerencias de Fauci <sup>(59)</sup> quien propuso que la capacidad regenerativa anormal de los linfocitos T CD4<sup>(+)</sup>, maduros, podría deberse a la infección del HIV, ya sea en ellas mismas, en sus células precursoras, en sus células madres, o en las células que se encargan de sintetizar los factores de crecimiento necesarios para la regeneración de los linfocitos mencionados.

Schnittman y su equipo ya habían observado, en 1990, que los precursores intratímicos de células T, en diferentes etapas de su desarrollo, podían infectarse con el HIV. En ese mismo año, también se habían encontrado algunas fallas en el funcionamiento del microambiente intratímico, específicamente en las células epiteliales [TE] y en las células dentríticas. Además, los estudios realizados sobre ellas revelaron que las primeras podían producir IL-6, IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , G-CSF, GM-CSF y LIF, *in vitro*, las cuales eran citocinas necesarias para la proliferación y la diferenciación de los precursores hematopoyéticos que migran al timo durante el desarrollo fetal y postnatal del hombre <sup>(149)</sup>.

Otro resultado de este mismo estudio realizado por el grupo de Schnittman <sup>(251)</sup> reveló que el suero fetal de ternera es un buen inductor de la secreción de IL-6 (10,000 pg/ml, dependiendo de la concentración del suero) y del RNAm para esta misma interleucina en los cultivos de células TE. El efecto inductor del suero en la síntesis de IL-6 se pudo inhibir parcialmente (20-50%) cuando al medio se adicionaron anticuerpos anti-IFN $\gamma$ . En base a estos resultados ellos concluyeron que el IFN $\gamma$  promueve, por sí solo, la síntesis de IL-6 en los cultivos de células epiteliales tímicas, ya que la producción de la interleucina se neutralizaba considerablemente con anticuerpos policlonales [pAc] anti-IFN- $\gamma$ .

Por otra parte, debido a que en años anteriores se había informado que el PMA, la IL-6 y el GM-CSF podían estimular la multiplicación del HIV en la clona de promonocitos U1, crónicamente infectada con este virus, Schnittman *et al* <sup>(251)</sup> decidieron comprobar si ese mismo efecto se podía obtener con los sobrenadantes de cultivos de células productoras de IL-6. Para ello, primero cultivaron células TE en presencia de suero normal humano. Posteriormente, el sobrenadante de este cultivo fue adicionado al medio en donde estaban suspendidas las células U1. En este último cultivo se pudo observar que las células aumentaron 20 veces su actividad de transcriptasa reversa, misma que se pudo bloquear con Ac anti-IL-6.

En base a todos sus resultados Schnittman y su equipo <sup>(251)</sup> propusieron que la inducción de IL-6, provocada por la presencia natural de IFN $\gamma$  en el suero humano, podía ser un evento fisiológico que contribuye a la inmunopatogénesis de la infección por el HIV en los timocitos y, por ende, a que no se pueda restablecer el *pool* de ellos, a pesar de que se les administren agentes antirretrovirales a los pacientes con el SIDA. Los mismos autores sugieren que una alteración en el microambiente tímico pudiera ser otro

factor que contribuye a la disminución de los linfocitos T maduros en los pacientes con esta enfermedad. Esta proposición la hacen porque en niños y adultos con SIDA se ha observado una involución grave del timo, acompañada de una reducción de sus poblaciones de linfocitos y célula epiteliales. Estos últimos cambios no son exclusivos de este padecimiento, ya que también se han encontrado en pacientes con la enfermedad injerto contra huésped y en algunas inmunodeficiencias congénitas.

## 9. 12. IL-6 y cáncer.

Ya que la IL-6 es el principal mediador de la respuesta del huésped al daño tisular, se ha pensado que ella es la responsable de algunos síntomas y alteraciones en los resultados de laboratorio que presentan los pacientes cancerosos, tales como el aumento de la velocidad de sedimentación globular [VSG] y las variaciones en la concentración de las proteínas plasmáticas <sup>(259)</sup>.

De la misma forma, la intervención de la IL-6 como promotor de la proliferación tumoral ha sido una hipótesis sostenida por varios investigadores <sup>(81, 180)</sup>, ya que se ha observado que los ratones con tumores sólidos transplantables poseen valores elevados de IL-6 circulante, que se correlacionan con la extensión del tumor. Además, se sabe que esta interleucina incrementa la motilidad, disminuye las uniones adherentes y provoca cambios fenotípicos en las líneas celulares T47D y ZR-75-1 de carcinoma de seno, lo cual pudiera aumentar la invasividad de dichos tumores <sup>(295)</sup>.

Asimismo, se ha visto que, en los ratones, la producción de la IL-6 aumenta rápidamente poco después de la implantación de diferentes tipos de células tumorales. En estos casos, la mayor parte de la IL-6 es producida por los linfocitos T de los animales que reciben el implante tumoral <sup>(311)</sup>. En los humanos con tumores, su producción es inducida *in vivo* por la IL-2 o el TNF. Se cree que en las personas con cáncer por lo general se encuentran elevados los niveles de la IL-6 en la circulación <sup>(122)</sup>. Esta proposición se apoya en que el tejido tumoral fresco de mixoma cardíaco contiene grandes cantidades de esta interleucina <sup>(99)</sup>. Lo mismo sucede en algunas líneas celulares tumorales, como la T24 del carcinoma de vejiga <sup>(257)</sup>, en células de mieloma <sup>(129)</sup>, en el sarcoma de Kaposi asociado a SIDA <sup>(218)</sup>, en pacientes con cáncer colorectal o de ovario <sup>(170)</sup> y en células de carcinoma renal <sup>(185)</sup>. Otros autores <sup>(15)</sup> han encontrado una correlación entre los niveles altos de IL-6 y la gravedad de la enfermedad en casos de

mieloma múltiple y en las leucemias de células plasmáticas. Entre los estudios que apoyan la idea de la promoción del crecimiento tumoral por la IL-6 esta el de Motro *et al* (195), para quienes esta interleucina parece ser un factor con actividad angiogénica. También se ha observado que esta glucoproteína puede detener la muerte celular programada en las células B de hibridoma sensibles a ella (242, 347).

Sin embargo, la actividad de la IL-6 hacia las células tumorales parece ser compleja, debido a que en algunos casos ayuda a la proliferación celular de mielomas (99, 135), mientras que en otros inhibe la proliferación de algunos carcinomas (44). Estos dos efectos contrarios se manifiestan al actuar directamente sobre dichas células en forma autócrina o parácrina, o al influir sobre ellas de una manera indirecta, modificando las actividades normales de las células del sistema inmunitario que responden contra esta clase de células malignas. Parece que el efecto parácrino de la IL-6 en las células tumorales no es exclusivo de ella, sino que son varias las citocinas que apoyan el crecimiento de los tumores. Tal es el caso de los macrófagos activados asociados a carcinomas de ovario que producen IL-1 e IL-6, las cuales incrementan el crecimiento de estas células malignas. Parte de la actividad de la primera interleucina se debe a la segunda, debido a que la administración de suero anti-IL-6 inhibe parcialmente el aumento del crecimiento tumoral.

En lo que respecta a los efectos antiproliferativos, se ha observado que la IL-6 es un factor autócrino, inducido por la IL-1, que interrumpe el crecimiento de las células de melanoma (191). También disminuye la aparición de metástasis tumorales en ratones inoculados con las células de un tumor transplantable que había sido inducido químicamente (196).

En cuanto a los efectos de la IL-6 sobre las células inmunocompetentes que están infiltradas en la masa tumoral, también existen publicadas opiniones opuestas. En algunos casos la IL-6 promueve el crecimiento de los linfocitos que infiltran el cáncer renal humano (152) y, en otros, deteriora las funciones de las células NK en ratones desnudos (298). La siguiente Tabla presenta algunos ejemplos de células tumorales sobre las que la IL-6 ejerce un efecto antiproliferativo o en los que contribuye a su crecimiento, según Martínez-Maza y Berek (170).



TABLA No. XIV. CELULAS CANCEROSAS SOBRE LAS QUE ACTUA LA IL-6

| MECANISMOS DE ACCION   |  |
|--|--|
| AUTOCRINOS   | PARACRINOS   |
| <b>Mieloma múltiple humano,<br/>Carcinoma renal,<br/>Sarcoma de Kaposi<br/>asociado a SIDA</b> | <b>Cáncer de ovario,<br/>Linfocitos B transformados por EBV,<br/>Linfoma de Lennert (linfocitos T)</b> |
| <b>Mieloma múltiple humano</b>   |  |

Un trabajo de Chen *et al* <sup>(44)</sup> informa, principalmente, acerca de la potente actividad inhibitoria que puede ejercer la rIL-6 (cuyo DNAc se obtuvo de las células de ovario de hamster chino) sobre el crecimiento de algunas líneas celulares de carcinoma y en células de leucemia/linfoma no-B. Esta actividad inhibitoria sobre el crecimiento de dichas líneas celulares se manifiesta utilizando concentraciones cercanas a las que se requieren para que dicha interleucina actúe como un factor estimulante del crecimiento de hibridomas y plasmocitomas [HPGF] y como estimulante de la secreción de Igs, en las células de plasmocitoma murino T1165 y en las células linfoblastoides humanas CESS . El efecto inhibitorio de la IL-6 en las células cancerosas se neutraliza en un 70-100% al emplearse anticuerpos contra un péptido sintético que reproduce el extremo N-terminal de la IL-6.

Entre las células cancerosas que detuvieron su crecimiento por efecto de la IL-6 están las células U937 de linfoma histiocítico humano (90%), las T47D de carcinomas de seno (70%-75%) y las MCF-7. Otras células malignas menos sensibles a la IL-6 que las anteriores, fueron las células humanas T Molt-4 de linfoma, las células Daudi del linfoma B de Burkitt, los fibroblastos diploides humanos FS11 y las células HeLa.

En 1989, Kimbauer *et al* <sup>(131)</sup> propusieron que la IL-6 producida por las células epiteliales, normales o cancerosas, podfan colaborar en el desarrollo de los tumores. Esta hipótesis tuvo como fundamento los resultados de sus estudios y el hecho de que distintos tumores pueden secretar grandes cantidades de esta interleucina. Ellos encontraron que los cultivos de las líneas celulares de carcinoma epidermoide y los queratinocitos normales de la piel humana producen constitutivamente una IL-6 con peso molecular de

12-28 kDa y su correspondiente RNAm, cuando se multiplican en presencia de suero fetal de ternera [FCS]. Asimismo, la síntesis de IL-6 se vió aumentada en presencia de Con-A, sílica, PMA e IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  humanas. El RNAm específico para IL-6 sólo aumentó cuando las células estuvieron en contacto con las tres últimas sustancias. Los mismos autores <sup>(131)</sup> también observaron que los anticuerpos anti-rIL-6 bloquearon la actividad de dicha citocina sobre las células B9 (una línea celular de plasmocitoma murino, cuya proliferación es dependiente de la IL-6).

El grupo de Tabibzadeh <sup>(288)</sup> también ha informado la presencia de IL-6 inmunorreactiva en varios tumores como los carcinomas primarios de células escamosas de mama, colon, ovario y endometrio, los adenocarcinomas con metástasis hacia ganglios linfáticos, los tumores de músculo liso (leiomiocarcinoma), el neurofibrosarcoma y los linfomas Hodgkin y no Hodgkin. Por estos hallazgos ellos apoyan la idea de que las células tumorales pueden producir IL-6 en forma constitutiva y creen que esta interleucina puede ser un mediador importante de las interacciones entre el huésped y el tumor. Aunque en los tejidos sanos como los de la piel, los de la superficie y del epitelio glandular de la mucosa gástrica y de los túbulos renales también se pudo demostrar la presencia de IL-6, los autores mencionados <sup>(288)</sup> consideran que en estos otros tejidos, sanos, la IL-6 está ejerciendo un efecto inhibitorio de su proliferación.

Por su parte, Sawada *et al* <sup>(248)</sup> han informado que, en la mayoría de los pacientes con leucemia de células T de adulto [ATL] estudiados por ellos, sus células malignas cultivadas producen IL-6 espontáneamente. Esta interleucina fue encontrada únicamente en el medio condicionado donde se cultivaron los linfocitos provenientes de dichos enfermos, alcanzando una concentración máxima de 19.6 ng/ml.

Se cree que los niveles elevados de IL-6 encontrados en ese estudio <sup>(248)</sup>, pudieran tener alguna relación con las anomalías comúnmente observadas en el cromosoma 7 de los linfocitos poco diferenciados, comprometidos por esta clase de leucemia. Asimismo, la presencia de la citocina puede explicar algunas de las manifestaciones clínicas observadas en pacientes con ATL, como la trombocitosis y los incrementos en los niveles de la proteína C reactiva [CRP] y en la velocidad de sedimentación globular [VSG] <sup>(36, 163)</sup>.

Otras células tumorales capaces de producir IL-6 en forma constitutiva han sido la mayoría de las líneas celulares epiteliales de carcinoma ovárico (CAOV-3, OVCAR-3 y

SK-OV-3), estudiadas por Watson *et al* <sup>(336)</sup> en 1990. La cantidad de IL-6 secretada por estas líneas celulares es distinta en cada una de ellas, aunque depende de la concentración de las células cultivadas y se incrementa, considerablemente, después de la adición de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  al medio de cultivo. Las isoformas de IL-6 secretadas por las células mencionadas poseen, principalmente, un peso molecular de 24 kDa, aunque también las había de 27-28 kDa.

La IL-6 también ha sido encontrada en los cultivos primarios de tumores ováricos recién extirpados y en todos los líquidos de ascitis que han sido estudiados en pacientes con cáncer de ovario, alcanzando concentraciones hasta de 40 ng/ml. Sin embargo, sólo en las células SKOV-3 y CAOV-3 se encontró que el RNAm para la IL-6 era producido en forma constitutiva. Aunque se desconoce la función que ejerce la IL-6 en estas células, diferentes autores opinan que ella podría ser un factor de crecimiento, cuya expresión anormal podría contribuir a la diseminación del cáncer de ovario.

Por otra parte, algunas líneas celulares de hígado humano y las células Chang, HLE y HLF también pueden producir IL-6 *in vitro*, en forma constitutiva,. Su producción se incrementa al estimularlas con TPA aunque, en las células Chang, el TNF y la IL-1 $\beta$  también pueden estimular su síntesis; lo mismo sucede con el RNAm de la interleucina <sup>(175)</sup> .

En 1990 Siegall *et al* <sup>(266)</sup> informaron sobre la producción de una molécula quimérica con actividad citotóxica para algunas líneas celulares tumorales. Dicha sustancia, llamada (IL6-PE40), está compuesta por la IL-6 más las fracciones ADP-ribosilante y el dominio translocante de la toxina de 40 kDa de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Las células más sensibles a la molécula quimérica fueron las líneas H929 y U266 de mieloma humano (ésta última estudiada inicialmente por Siegall *et al* <sup>(267)</sup>) y las líneas PLC/PRF/5 y Hep3B, procedentes de hepatomas humanos. En cambio, la línea de histiocitoma humano U937 y la línea celular HEPG2 de hepatoma fueron menos sensibles que las anteriores. En el caso de las células de hepatoma, la sensibilidad hacia la molécula quimérica se correlacionó con el número de IL-6R presentes en la superficie de la membrana.

Durante 1991, el equipo de Meyers <sup>(184)</sup> demostró la presencia de IL-6 y de IL-6R en las líneas celulares EJ/T24 y G-2451 de tumores de vejiga. Este hallazgo confirmó lo

informado anteriormente por Yasukawa *et al* <sup>(346)</sup> en relación a la expresión de IL-6 por las células transicionales de carcinoma [TCC].

La literatura publicada sobre las relaciones entre IL-6 y cáncer es muy abundante. Se puede mencionar que Tanner y Tosato <sup>(298)</sup> informaron en 1991, algunas observaciones interesantes, que sugieren la participación de la IL-6 en la tumorigenicidad de ciertas neoplasias y en la interacción huésped-tumor en ratones atímicos o desnudos. Ellos observaron una serie de actividades notables en las células B normales, después de que se les inmortalizó infectándolas con el EBV y luego se les introdujo el gene de la hIL-6. Las células transfectadas secretan mayores cantidades de IL-6 (6,500-40,000 U/ml del sobrenadante del medio de cultivo). Por otra parte, después de ser inyectadas por vía subcutánea a los ratones atímicos o desnudos, incrementan la incidencia y disminuyen el tiempo de la presentación de los tumores (linfomas). Además, la tumorigenicidad de estas líneas celulares fue transferible a otras células linfoblastoides. Los medios condicionados de las células provenientes de los linfomas generados en los ratones atímicos, contenían más IL-6 que los cultivos de las células linfoblastoides a las que se les injertó el gene de la interleucina señalada y de las cuales se originaron dichos tumores. La mayor parte de esta citocina era de origen murino. Asimismo, las líneas celulares derivadas de estos linfomas detuvieron su proliferación en presencia de IL-6 exógena, a concentraciones de 104 a 108 U/ml.

Una de las actividades más importantes observada en este estudio es que la IL-6, a dosis elevadas, parece contribuir a que las células tumorales escapen de la vigilancia inmunológica del huésped, al reducir la eliminación de las células neoplásicas por las células activadas por linfocinas [LAK]. De este modo la IL-6 contribuyó a aumentar la tumorigenicidad que presentaron las células inmortalizadas con el EBV que fueron utilizadas en los experimentos de Tanner y Tosato. Estos dos investigadores tomaron células del bazo de los ratones desnudos y las cultivaron con IL-2 (400 U/ml), en presencia o en ausencia de IL-6 (108 U/ml). Después de 4 días, vieron que su actividad citotóxica fue menor en los cultivos celulares que contenían las dos interleucinas referidas que en el caso de los cultivos a los que sólo se les añadió la primera de ellas. La citotoxicidad de los esplenocitos se determinó según su capacidad para eliminar una de las líneas linfoblastoides utilizada en ese estudio y una línea celular que era sensible a las células asesinas naturales [NK]. La IL-6 por sí sola no tuvo efecto citotóxico alguno sobre estas dos líneas celulares.

Aunque Tosato *et al* (304, 305, 307), habían encontrado que la IL-6, a concentraciones entre 10 y 100 U/ml, promueve el crecimiento de los linfocitos B infectados por el EBV, también se ha observado que, a concentraciones de más de 5,000 U/ml, esta misma interleucina inhibe el crecimiento de dichas células, dependiendo de la dosis. En líneas generales, se sabe que a concentraciones menores o iguales que 1 U/ml, la IL-6 activa a las células NK humanas (167), mientras que las concentraciones elevadas de esta interleucina disminuyen la expresión de los receptores de los monocitos para la misma (16). Tanner y Tosato (298) no descartan la posibilidad de que parte de la IL-6 encontrada en los sobrenadantes de sus cultivos sea producida por monocitos activados. Probablemente esta interleucina contribuya a incrementar la tumorigenicidad, al disminuir la expresión de los genes de la IL-1 $\beta$  y del TNF en esas células, tal y como lo han informado Schindler *et al* (250) en 1990.

Willheim *et al* (339) también han estudiado la actividad de la IL-6 sobre líneas celulares leucémicas. En 1991, ellos observaron, *in vitro*, que las dosis altas de esta interleucina (1,000 U/ml) incrementaban la expresión del receptor para el Fc de la IgE [Fc $\epsilon$ RII/CD23], en las líneas celulares monoblasticas/monocíticas U937, THP-1 y Mono-Mac-6. Lo mismo ocurrió cuando a esos mismos cultivos se les agregó IL-4 o IFN $\gamma$ . Estas dos últimas citocinas mostraron un efecto aditivo con la IL-6, siendo, además, las que produjeron la expresión de las máximas cantidades del receptor mencionado. La inducción del Fc $\epsilon$ RII/CD23, promovida por la IL-6 se neutralizó con anticuerpos anti IL-6. El grupo de investigadores de Willheim notó que el efecto de IL-6 e IL-4 en la inducción del receptor Fc $\epsilon$ RII/CD23 se lleva a cabo a nivel genético, porque las interleucinas provocaron un aumento del RNA $m$  para éste último. Además, ellos (339) encontraron que la IL-6 y el IFN $\gamma$  disminuyen la expresión del receptor arriba mencionado, cuando dicha expresión es promovida por la IL-4.

En septiembre de 1991 se publicó el primer trabajo que informaba sobre el uso de anticuerpos anti-IL-6 como un tratamiento antitumoral en el hombre. En este estudio de Klein *et al* (136), se administraron, intravenosamente y durante dos meses, dos tipos de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-6 a un paciente con leucemia de células plasmáticas. Los resultados mostraron que es factible el empleo de anticuerpos anti-IL-6 en el tratamiento de diversas enfermedades en las que esta interleucina se encuentra elevada, tal y como habían sugerido distintos investigadores. Además, los resultados contribuyeron a esclarecer un poco más las actividades de la IL-6 *in vivo*. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-IL-6 mejoró temporalmente el estado clínico del

paciente; disminuyó la fiebre, los niveles de calcio, los niveles de IgG monoclonal en el suero y las cantidades de CRP y  $\alpha$ 1-antitripsina en el suero, así como también bloqueó la proliferación de las células del mieloma en la médula ósea. Los únicos efectos adversos que produjo esta terapia fueron una inmunización transitoria contra los anticuerpos murinos, a los 15 días de iniciada, y la disminución de las cuentas de neutrófilos y plaquetas circulantes.

Dos años antes, algunos de estos mismos investigadores <sup>(15)</sup> habían aportado evidencia que implicaba a la IL-6 en la proliferación de las células malignas de la médula ósea de personas con un mieloma terminal. Ellos habían encontrado niveles elevados de IL-6 en estos pacientes, particularmente en aquellos con leucemia de células plasmáticas. En otro estudio publicado en ese mismo año de 1989, Zhang, Klein y Bataille <sup>(35)</sup> hallaron que, *in vitro*, las células de mieloma que mejor respondieron a la adición de IL-6 exógena fueron aquellas que provenían de pacientes con mielomas que se encontraban proliferando *in vivo*.

En marzo de 1992 se publicó un estudio de Solary *et al* <sup>(27)</sup> sobre la correlación existente entre los niveles de IL-6 en el suero y diversos parámetros biológicos, en pacientes a quienes se les acababa de hacer el diagnóstico de diferentes gammapatías monoclonales. Mediante un radioinmunoensayo específico para esta interleucina, ellos <sup>(27)</sup> lograron medir la concentración de la IL-6 en el suero tanto en los voluntarios sanos como en los pacientes con gammapatías monoclonales. En los primeros, los niveles de la IL-6 estuvieron entre los 122 y 466 pg/ml (promedio 294<sup>+-</sup>86 pg/ml). En el caso de los enfermos, la concentración de la IL-6 rebasó los 500 pg/ml. El estudio fue realizado sobre personas con el diagnóstico de leucemia, macroglobulinemia, mieloma múltiple [MM], linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

Los valores mayores a los 700 pg/ml fueron encontrados en los casos de leucemia aguda, linfoma maligno o mieloma múltiple. Los máximos niveles de IL-6 fueron observados en pacientes con leucemia aguda monoblástica, en linfoma de Hodgkin estadio IV y en linfoma no Hodgkin de alto grado, quienes tenían 1774, 8211 y 8887 pg/ml, respectivamente. Únicamente en el grupo de personas con mieloma múltiple se encontró una correlación entre los niveles de IL-6 y la plasmocitosis de médula ósea, así como las concentraciones de calcio, lactato deshidrogenasa y  $\beta$ 2-microglobulina en el suero. Cabe señalar que, ya Schindler *et al* <sup>(25)</sup>, en 1990, habían informado un promedio de IL-6 plasmática de 187 pg/ml en personas sanas, utilizando también un

radioinmunoensayo. Los diferentes valores encontrados por estos autores y el equipo de Solary <sup>(271)</sup>, las explica este último grupo de investigadores por la falta de estandarización de los métodos utilizados, lo cual impide hacer comparaciones entre uno y otro procedimiento.

En pacientes con MM se ha visto que la IL-6 participa, de manera importante, en la destrucción del tejido óseo. Los osteoblastos producen una gran cantidad de esta interleucina y ella promueve la formación de osteoclastos que reabsorben el hueso. En los ratones, esta interleucina induce la aparición de lesiones en los huesos e hipercalcemia <sup>(24, 120)</sup>. En este mismo trabajo, Solary y colaboradores <sup>(271)</sup> apoyan la idea de que la IL-6 actúa como un factor autócrino o parácrino en linfomas y leucemias.

Finalmente, en un estudio reciente de Kreitman *et al* <sup>(142)</sup>, publicado en 1992, se ha comprobado que una mutante de la exotoxina de *Pseudomona aeruginosa*, fusionada con la IL-6 [IL-6-PE<sup>4E</sup>] es capaz de eliminar, selectivamente, células tumorales recién extraídas de algunos pacientes con mieloma múltiple [MM]. Los resultados demostraron que la IL-6 fue efectiva sobre las células malignas en 8 de 15 casos de la mencionada enfermedad. Esta molécula quimérica [IL-6-PE<sup>4E</sup>], a la cual se le cambiaron 4 aa básicos por glutamato, en la porción de la exotoxina, requiere tanto del dominio ribosilante de la toxina como de la IL-6 para ser citotóxica. Las células de mieloma más sensibles a ella fueron las que tenían una síntesis activa de protefnas. Estas células, colocadas en medio de cultivo, murieron en presencia de la molécula quimérica, cuando ésta alcanzaba concentraciones desde menos de 1 hasta 6 ng/ml; mientras que las células menos sensibles necesitaron entre 30 y 140 pg/ml. Los autores <sup>(142)</sup> no encuentran todavía una explicación al por qué unas células de MM fueron sensibles a dicha molécula híbrida y otras no, pero opinan que quizás ésto se debe a la baja cantidad de IL6R que algunas de ellas expresan, lo cual concuerda con lo informado por Kawano *et al* <sup>(129)</sup> quienes encontraron que no todas las células de mieloma expresan grandes cantidades de este receptor. Algunas apenas poseen 140 receptores/célula.

### 9. 13. IL-6 y la enfermedad de Alzheimer .

La enfermedad de Alzheimer está causada por un proceso degenerativo del cerebro que provoca una atrofia cortical. Como una consecuencia, en diversas zonas de la corteza y del hipocampo ocurre una pérdida de neuronas, enredos de neurofibrillas,

formación de placas seniles y depósitos vasculares del péptido  $\beta$ -amiloide. Estos últimos depósitos están formados por un residuo peptídico de 40 aa y por la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, aunque esta última en menor cantidad.

Vandenabeele y Fiers <sup>(322)</sup>, en 1991, apoyan la hipótesis de que el origen de la enfermedad de Alzheimer puede ser la consecuencia de una reacción de fase aguda cerebral, en la que intervienen la IL-1 y la IL-6. Estos autores proponen que IL-1 puede inducir la síntesis de IL-6, que es el principal mediador de la respuesta de fase aguda. Como la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina es una protefna de fase aguda, ellos consideran posible que la síntesis de ésta última es inducida en el cerebro después de la producción de las dos citocinas anteriores, junto con los precursores de la protefna amiloidea [APP]. En apoyo de su teoría, ellos toman en cuenta los siguientes hechos. 1) La  $\alpha$ 1-antiquimotripsina y los péptidos  $\beta$ -amiloides se producen en los astrocitos y en las neuronas, respectivamente, es decir que se originan en áreas afectadas por esta enfermedad. 2) La IL-1 y la IL-6 son inductores de la síntesis de  $\alpha$ 1-antiquimotripsina en células hepáticas y de hepatoma, además de que la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina y otros APP poseen en su promotor una secuencia consenso que también se ha identificado en la región del promotor de protefnas inducibles por la IL-6. 3) Se han encontrado receptores para IL-1 e IL-6 en astrocitos. 4) La IL-1 y la IL-6 se producen en las células de la microglía.

Vandenabeele y Fiers <sup>(322)</sup> creen que el incremento en la producción de IL-1 e IL-6 en el cerebro puede ser inducida por diferentes factores. Entre los más comunes, proponen : 1) daños inespecíficos del cerebro que desencadenan una respuesta de fase aguda; 2) la activación de las células de la microglía por contacto con linfocitos T, en el curso del envejecimiento; 3) la formación, a distancia, de linfocitos T autorreactivos, con receptores específicos para el péptido  $\beta$ -amiloide, que promueven la producción de citocinas y, 4) las infecciones virales repetidas o persistentes. Sin embargo, los mismos autores reconocen que no se han encontrado niveles altos de IL-6 en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, aunque ellos piensan que IL-6 sí está aumentada en el líquido cefalorraquídeo [LCR], debido a que en la mayoría de las infecciones virales o bacterianas del SNC se encuentran valores altos de IL-6 en LCR y, no obstante, ésto no se refleja en sus niveles séricos.

Pese a lo anterior, Vandenabeele y Fiers <sup>(322)</sup> creen que, tal vez, la producción escasa aunque sostenida y focalizada de IL-6 puede ser más dañina que un incremento considerable pero, transitorio y sistémico. Además, piensan que es posible que en este



último caso no se encuentre esta interleucina ni otros APP en el LCR , porque se producen en otros sitios específicos.

Ganter y colaboradores <sup>(74)</sup> en 1991, también han apoyado la hipótesis de que, probablemente, en las células de neuroblastoma humano, la IL-6 participa en la transformación de la proteína precursora beta amiloide mediante la estimulación de la síntesis de la  $\alpha 2$ -macroglobulina.

#### 9. 14. IL-6 y la enfermedad de Paget

La enfermedad de Paget se manifiesta por deformaciones toscas de los huesos a causa de un aumento en el número de los osteoclastos, los cuales son más grandes, mas activos y multinucleados. Los osteoclastos presentan inclusiones citoplásmicas que parecen ser de naturaleza viral y, además, expresan antígenos de paramixovirus, lo cual hace suponer que la enfermedad está causada por virus, aunque hasta ahora se desconoce el mecanismo que contribuye a elevar la actividad de los osteoclastos.

Desde hace pocos años se conoce que la IL-6 participa en el control de ciertas funciones celulares en el hueso y que los osteoblastos como otras células de la médula son capaces de producirla <sup>(62, 166)</sup> . En 1990 se demostró que la IL-6 aumenta la formación de células multinucleadas [MNC] en los cultivos de médula ósea humanos <sup>(146)</sup>, al igual que la producción de las citocinas IL-1, GM-CSF y TNF $\alpha$ .

En 1992, Roodman *et al* <sup>(240)</sup> informaron que la aparición de osteoclastos multinucleados puede estimularse al colocar las células mononucleares de la médula ósea normal en un medio que ha sido condicionado con cultivos a largo plazo de la médula ósea de pacientes con la enfermedad de Paget. Ellos también observaron que la IL-6 es parcialmente responsable de este efecto, puesto que los anticuerpos anti-IL-6 neutralizaron la formación de las MNC. Además, los mismos autores observaron que, tanto el plasma separado de la médula ósea del hueso comprometido por la enfermedad, así como el suero separado de la sangre de las personas con la misma enfermedad, contienen cantidades elevadas de IL-6, (21-300 pg/ml y 11-710 pg/ml, respectivamente). En cambio, los medios condicionados con cultivos de células de la médula ósea normal contienen concentraciones bajas de IL-6 y no promueven la formación de MNC, a pesar de que la interleucina se encuentra en el rango de concentraciones al que promueve la

formación de estas células anormales. Por otra parte, el suero normal contiene muy poca cantidad de la misma interleucina.

Por todo lo anterior, los autores de este trabajo <sup>(240)</sup> concluyeron que la IL-6 es el factor autócrino o parácrino que se produce durante la activación de los osteoclastos y el responsable del recambio óseo que se observa en las lesiones activas de la enfermedad de Paget. Ellos consideran que los osteoclastos multinucleados son los principales productores de la IL-6, aunque no son las únicas células que la producen. También creen que otros factores, presentes en los cultivos de médula ósea de pacientes con este padecimiento, pueden contribuir a la formación de las MNC.

### **9. 15. IL-6 y las enfermedades desgastantes.**

No se encontró literatura que relacione directamente la producción de IL-6 con este tipo de enfermedades. Sin embargo, se puede inferir que la IL-6, lo mismo que la IL-1 y el TNF $\alpha$ , debe tener una participación muy importante en la expresión de las diversas manifestaciones del desgaste, ya que éste es un síndrome que reúne las consecuencias de la disfunción neuroendocrinoinmunológica que caracteriza la etapa terminal de varias enfermedades crónicas como el cáncer, el SIDA o la tuberculosis. En los incisos anteriores se han mencionado brevemente los estudios que revelan un aumento en la síntesis de IL-6 en personas con infecciones y enfermedades malignas, así como la producción de la misma interleucina por cierto tipo de tumores.

Es probable que la mejoría clínica observada en cancerosos, a los cuales se ha aplicado un tratamiento con anticuerpos anti-IL-6, tenga más relación con la atenuación del deterioro físico e inmunológico de los pacientes (la principal característica del desgaste), que con una regresión de la enfermedad primaria. Asimismo, también es probable que la inyección experimental de IL-6 en animales de laboratorio sanos provoque una pérdida de peso que puede llegar a la caquexia, en una forma similar a la observada en animales inyectados con caquectina o TNF $\alpha$ . El estudio de la participación de la IL-6 en la patogenia de los síndromes desgastantes puede conducir a la introducción de nuevas medidas terapéuticas que ayuden a la recuperación física e inmunológica de estos pacientes y que, de este modo, permitan el tratamiento más efectivo de la enfermedad primaria.

## 10. Resumen

---

La revisión de la literatura consultada demuestra que la IL-6 es uno de los mensajeros inmunológicos más versátiles que se conocen hoy en día. En un lapso corto, de 3 a 7 años, se han identificado la localización y estructura de su gene, la secuencia de aminoácidos de la molécula, las isoformas que presenta, las sustancias que inducen la expresión de su gene, los tipos de receptores a los que se une, las células que la producen y la gran diversidad de actividades biológicas que lleva a cabo, tanto *in vivo*, como *in vitro*. La mayoría de esas actividades biológicas son estimulatorias e IL-6 las ejerce para el control de la respuesta inmunitaria celular y humoral. Sin embargo, la interleucina también participa en el control de la hematopoyesis, de la respuesta de fase aguda y de las interacciones entre los sistemas inmunitario y neuroendócrino. IL-6 también promueve o inhibe la proliferación de algunas líneas de células tumorales.

Debido a que actúa como factor de crecimiento autócrino en varias enfermedades proliferativas y autoinmunes, se ha sugerido que la expresión anormal de su gene está implicada en la patogenia de las mismas. Niveles elevados de esta glucoproteína se han encontrado en diversas enfermedades como las infecciones bacterianas, el mieloma múltiple, el SIDA, los linfomas, el lupus eritematoso sistémico, la glomerulonefritis proliferativa del mesangio, la artritis reumatoide, distintos tipos de cáncer, la diabetes mellitus y la enfermedad de Paget, entre otras. Estos hallazgos han conducido al uso de anticuerpos anti-IL-6 como una medida terapéutica que, en algunos casos, ha reducido la gravedad de algunas manifestaciones clínicas o retardado el progreso de la enfermedad. Varios autores han propuesto el uso de medicamentos que bloqueen la inducción de su síntesis para aplicarlos al tratamiento de enfermedades en las cuales se encuentra aumentada la producción de la interleucina. Aunque los resultados obtenidos hasta ahora no son definitivos, la manipulación de la síntesis y de las actividades biológicas de la IL-6 representan, actualmente, una de las opciones más prometedoras en el campo de la inmunomodulación con fines terapéuticos.

## 11. Comentarios finales y conclusiones

---

La IL-6 es una fosfo-glicoproteína que desempeña múltiples funciones estimuladoras e inhibitorias. Básicamente, actúa como un modulador positivo de diversas reacciones para la protección y la reparación de los tejidos del cuerpo, tales como las respuestas inflamatoria e inmunológica. En el primer caso, promueve la síntesis de la mayoría de las proteínas de fase aguda y produce fiebre. En el segundo, estimula la inmunidad celular y humoral, al promover la activación, proliferación y el crecimiento de los linfocitos T, de las células T citotóxicas y de las células NK y, además, al colaborar en la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas, productoras de anticuerpos.

Otras actividades importantes en las que participa IL-6 son la formación de colonias hematopoyéticas de multilineaje, la diferenciación de los megacariocitos, la secreción de algunas hormonas hipofisarias y la estimulación o inhibición de la proliferación de ciertas líneas de células tumorales.

IL-6 puede producirse de manera fisiológica ante estímulos internos, como las citocinas IL-1, TNF, IFN $\gamma$ , PDGF, GM-CSF y suero, o ante estímulos externos como las infecciones bacterianas, parasitarias o virales y cualquier agente físico o químico que cause daño tisular. IL-6 se produce ubicuamente por una gran variedad de células, entre las que se encuentran los monocitos y los macrófagos, los fibroblastos, las células endoteliales y epiteliales, las células del mesangio, las células del endometrio, las células foliculo estrelladas de la hipófisis, las células de la microglía, las células  $\beta$  del páncreas, los linfocitos T o B y las células tumorales derivadas de distintos órganos y tejidos.

Descubierta hace poco más de 11 años, es una de las interleucinas más estudiadas. Sobre ella se ha reunido una información considerablemente amplia, con la ayuda de algunas técnicas de separación, purificación y secuenciación de proteínas, la clonación

molecular del DNAc para la IL-6 y el uso de cultivos celulares. Sin embargo, falta conocer su estructura tridimensional y la naturaleza de las señales intracelulares que activa cuando se une a sus correspondientes receptores.

En vista de que el gene de la IL-6 posee varios sitios de iniciación de su transcripción, es posible que ellos estén relacionados con la presencia de las distintas isoformas encontradas de esta interleucina. Tal vez, ellas también deban su presencia al tipo de inductor que se emplee, o al tipo de célula en la que se induzca la síntesis de IL-6.

Algunos autores han sugerido que la asociación del IL-6R a la gp130 es un nuevo mecanismo mediante el cual se activan las células, a diferencia de la manera clásica, en la cual un ligando se une a su correspondiente receptor, haciendo que la célula se active y manifieste un efecto final conocido. La gp130 contribuye a la formación de sitios de alta afinidad para la IL-6, además de ser la responsable de transmitir la señal generada por la unión de esta interleucina a su correspondiente receptor. En lo personal, creo que la IL-6 genera dos tipos de señales intracelulares. Una que depende de su unión al IL-6R solo (en los receptores de baja afinidad) y otra por la vía de la gp130 (en los receptores de alta afinidad). Es probable que la utilización de alguna de estas dos señales dependerá del tipo de receptor para IL-6 que posea cada célula.

Las diversas actividades que manifiesta IL-6 no son exclusivas de ella, puesto que comparte algunas con otras citocinas, lo cual resulta algo bastante común entre esta clase de moléculas. Es posible que las actividades que desarrolla *in vivo* no las efectúe por sí sola, sino en combinación con otras citocinas, ya que todas ellas ejercen su acción de manera coordinada, para promover o inhibir ciertas funciones corporales.

Pudiera ser que las actividades antagónicas que manifiesta la IL-6 en diferentes tejidos y células sean el resultado de que la molécula puede activar diferentes mecanismos de acción bioquímica, que éstos se encuentren relacionados estrechamente con el microambiente en el que actúe la interleucina, o de que las actividades biológicas de la IL-6 se relacionan con las diferentes isoformas que han sido encontradas hasta ahora.

Como muchas de las proteínas producidas por mamíferos, la molécula conserva diferencias antigénicas de especie, puesto que la IL-6 humana actúa sobre células de ratón, mientras lo contrario no ocurre. El factor de crecimiento de hibridomas felino,

que posee actividad de IL-6, no puede neutralizarse con un suero anti BSF-2/IL-6 humana. Además, como la IL-6 recombinante es 100 veces más pirogénica que la natural, se ha pensado en la posibilidad de que las modificaciones postraduccionales sean las que controlen algunas de las actividades de dicha citocina.

En vista de que, en algunas células, esta interleucina ejerce ciertas funciones que no provoca en otras y de que existen efectos específicos de ella, que dependen de la concentración a la que se le emplea, puede decirse que su actividad observable puede variar según el tipo de célula blanco, la cantidad y el tipo de interleucina utilizada.

Hasta ahora se sabe que los distintos inductores de la IL-6 ponen en marcha tres tipos de segundos mensajeros de la activación celular: la formación de AMPc, la activación de las proteínas cinasa A o C y el intercambio de iones de  $Ca^{2+}$ . Estos son los mismos mensajeros que se encargan de transmitir la señal que genera cada uno de los CSFs, cuando se unen a sus correspondientes receptores. En cuanto a la IL-6, lo único que se sabe, con respecto a la señal que transmite, es que, en las células del mesangio de rata, incrementa los niveles de  $1,4,5-P_3$  y de  $Ca^{2+}$  intracelular, así como la síntesis de  $PGE_2$ .

La escisión del  $PIP_2$  o fosfoinosítido [PI] contribuye a aumentar la secreción de insulina en las células  $\beta$  de los islotes del páncreas, para que estas células produzcan IL-6, la cual, a su vez, también induce la secreción de dicha hormona en las mismas células. Las observaciones anteriores permiten proponer que la IL-6 puede tener como función adicional, además de las ya comprobadas, promover la secreción de insulina en los islotes de Langerhans.

Ciertos síntomas como la fiebre y el incremento en la síntesis de las proteínas de fase aguda, la proliferación de las células de mieloma o la multiplicación del HIV *in vitro*, parecen correlacionarse con los altos niveles de IL-6 encontrados en pacientes con infecciones, cáncer o SIDA. Por esta razón, diversos investigadores han llegado a pensar que IL-6 interviene en la patogenia de algunas enfermedades. Sin embargo, no se ha podido demostrar su participación directa en ellas. De modo que, también es posible que su sobreproducción sólo sea un evento secundario en estos padecimientos.

Llama la atención que algunos investigadores mencionan haber encontrado una relación entre los niveles de la IL-6 circulante y el estadio de ciertas enfermedades, mientras que en otros padecimientos dicha relación no se ha podido establecer.

Considerando que, al aumentar su concentración en algunos líquidos biológicos, la IL-6 es una glucoproteína que pone de manifiesto la presencia de alguna infección o la existencia de un daño tisular, quizás se esperaría que en todos los casos en que se encuentra elevada, sus niveles deberían de mantener una correlación con la severidad de la lesión y, sin embargo, esto no sucede siempre. Quedan por conocer los factores que motivan esta situación.

Por otro lado, en los casos en los que se encuentran valores altos de IL-6 local y bajos en suero, pudiera ser que la actividad fundamental de la IL-6 se está llevando a cabo en el sitio de la lesión y que sus actividades biológicas se focalizan sobre las células de soporte y sobre las que llegan a ese sitio, por lo que no resulta tan necesaria a nivel sistémico.

Aunque se ha determinado la ubicación cromosómica del gene de la IL-6 y se han identificado varias sustancias que pueden inducir su expresión, todavía se desconocen los mecanismos que lo activan y lo desactivan. Más adelante, la manipulación de estos mecanismos podría permitir el control de la sobreproducción de IL-6, en aquellas enfermedades en las que sus niveles están muy elevados.

En cuanto a la acción de la IL-6 sobre el sistema neuroendócrino, todo parece indicar que su función más importante es servir de mensajero entre los sistemas inmunitario y neuroendócrino, lo cual explicaría algunas de las interrelaciones existentes entre ellos.

Se conoce con certeza que tanto la hipófisis como el hipotálamo pueden producir IL-6, la cual promueve *in situ* la liberación de hormonas hipofisarias como la ACTH. Esta última fomenta la conversión del colesterol en pregnenolona (precursor de todas las hormonas sexuales). Por otra parte, en el endometrio, la síntesis de IL-6 se inhibe por el  $17\beta$  estradiol. Analizados en conjunto, todos estos hallazgos revelan la existencia de un circuito de retroalimentación negativa para el control de la producción de la IL-6, en el cual participan los sistemas inmunológico, nervioso y endócrino, sólo que aquí la IL-6 es el mensajero y no las hormonas. Este circuito cerrado representa un novedoso proceso de modulación de las reacciones inflamatorias. En el promotor del gene de la IL-6 existen dos regiones que son sensibles a glucocorticoides.

Las actividades biológicas de la IL-6 sobre el endometrio y las células  $\beta$  del páncreas constituyen dos ejemplos adicionales que apoyan las hipótesis en favor de que los

sistemas inmunológico y neuroendócrino se encuentran íntimamente relacionados, a través de factores solubles o por medio de interacciones celulares. Todo esto demuestra que los dos sistemas son igualmente importantes para el mantenimiento de la homeostasis corporal.

Entre los posibles usos terapéuticos de la IL-6, los más prometedores son aquellos relacionados con el aprovechamiento de su actividad antiproliferativa sobre ciertas líneas celulares de leucemia/linfoma y de cáncer de seno <sup>(44)</sup>. De la misma manera, la IL-6 también ofrece posibilidades como una herramienta terapéutica en el caso de los trasplantes de médula ósea, si con ella se puede incrementar la supervivencia de las células humanas injertadas en este órgano hematopoyético, tal y como se ha logrado experimentalmente en ratones <sup>(132)</sup>.

Algunas de las estrategias propuestas para controlar la sobreproducción de IL-6 son el uso de fármacos bloqueadores de su producción o de su actividad, la inhibición competitiva del gene de la IL-6 con análogos de oligonucleótidos antisentido que se unan *in vivo* al segundo exón del gene de la IL-6 o al NF-IL6 <sup>(186)</sup> y la administración de bloqueadores del receptor para esta citocina (anticuerpos monoclonales u oligonucleótidos). Para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer también se ha sugerido la síntesis de moléculas quiméricas citotóxicas, por fusión de una proteína tóxica de *Pseudomonas aeruginosa* a la molécula de la IL-6 <sup>(142, 266, 267)</sup>, las cuales han producido algunos resultados prometedores.



## 12. Referencias bibliográficas

---

1. AARDEN, L.; LANSDORP, P.; DeGROOT, E.R. : A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes. *Lymphokines*, 1985, **10** : 175.
2. AARDEN, L.A.; DeGROOT, E.R.; SCHAPP, O.L.; LANSDORP, P.M. : Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1987, **17** : 1411.
3. ADERKA, D.; LE, J.; VILCEK, J. : IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 3517.
4. AGGARWAL, B.B.; KOHR, W.J.; HASS, P.E.; MOFFAT, B.; SPENCER, S.A.; HENZEL, W.J.; BRINGMAN, T.S.; NEDWIN, G.E.; GOEDEL, D.V.; HARKINS, R.N. : Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1985, **260** : 2345.
5. AKASHI, M.; LOUSSARARIAN, A.H.; ADELMAN, D.C.; SAITO, M.; KOEFFLER, H.P. : Role of lymphotoxin in expression of interleukin-6 in human fibroblasts : stimulation and regulation. *J. Clin. Invest.*, 1990, **85** : 121.
6. AKIRA, S.; ISSHIKI, H.; SUGITA, T.; TANABE, O.; KINOSHITA, S.; NISHIO, Y.; NAKAJIMA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.*, 1990, **9** : 1906.
7. AMADORI, A.; ZAMARCHI, R.; VERONESE, M.L.; PANOZZO, M.; BARELLI, A.; BORRI, A.; SIRONI, M.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A.; CHIECO-BIANCHI, L. : B cell activation during HIV-1 infection. II. Cell-to-cell interactions and cytokine requirement. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 57.
8. ANDREFF, M.; WELTE, K. : Hematopoietic Colony-stimulating Factors. *Sem. Oncol.*, 1989, **16** : 211.
9. ANDUS, T.; GEIGER, T.; HIRANO, T.; NORTHOFF, H.; GANTER, U.; BAUER, J.; KISHIMOTO, T.; HEINRICH, P.C. : Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/INF $\beta$ 2) regulates  $\beta$ -fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett.*, 1987, **221** : 18.
10. ASAOKU, H.; KAWANO, M.; IWATO, K.; TANABE, O.; TANAKA, H.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; KURAMOTO, T. : Decrease in BSF-2/IL-6 response in advanced cases of multiple myeloma. *Blood*, 1988, **72** : 429.
11. BACON, K.; GEARING, A.; CAMP, R. : Induction of in vitro human lymphocyte migration by IL-3, IL-4 and IL-6. *Cytokine*, 1990, **2** : 100.
12. BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. : Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84** : 1045.

13. BALKWILL, F.R.; BURKE, F. : The cytokine network. *Immunol. Today*, 1989, **10** : 299.
14. BAROJA, M.; CEUPPENS, J.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, A. : Cooperation between an anti-T cell (anti-CD28) monoclonal antibody and monocyte-produced IL-6 in the induction of T cell responsiveness to IL-2. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 1502.
15. BATAILLE R.; JORDAN, M.; ZHANG, X.G.; KLEIN, B. : Serum nivel of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84** : 2008.
16. BAUER, J.; MARTIN BAUER, T.; KALB, T.; TAGA, T.; LENGYEL, G.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; ACS, G.; MAYER, L.; GEROK, W. : Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression of human hepatocytes. *J. Exp. Med.*, 1989, **170** : 1537.
17. BAUMANN, H.; JAHREIS J.P.; SAUDER, D.N.; KOJ, A. : Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat and mouse. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** : 7331.
18. BAUMANN, H.; SCHENDEL, P. : Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266** : 20424.
19. BAUMANN, H.; WON, K-A.; JAHREIS, G.P. : Human hepatocyte-stimulating factor-III and interleukin-6 are structurally and immunologically distinct but regulate the production of the same acute phase plasma proteins. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264** : 8046.
20. BAZIN, R.; LEMIEUX, R. : Role of the macrophage-derived hybridoma growth factor in the in vitro and in vivo proliferation of newly formed B cell hybridomas. *J. Immunol.*, 1987, **139** : 780.
21. BAZIN, R.; LEMIEUX, R. : Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J. Immunol. Meth.*, 1989, **116** : 245.
22. BEAGLEY, K.W.; ELIDIDGE, J.H.; LEE, F.; KIYONO, H.; EVERSON, M.P.; KOOPMAN, W.J.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; MCGHEE, J.R. : Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.*, 1989, **169** : 2133.
23. BILLIAU, A. : Interferon  $\beta$ 2 as a promoter of growth and differentiation of B cells. *Immunol. Today*, 1987, **8** : 84.
24. BLACK, K.S.; MUNDY, G.R.; GARETT, I.R. : Interleukin-6 causes hypercalcemia in vivo and enhances the bone resorbing potency of interleukin-1 and tumor necrosis factor by two orders of magnitude in vitro. *J. Bone Mineral Res.*, 1990, **5** (supl 2) : 787.
25. BOT, F.J.; VAN EUK, L.; BROEDERS, L.; AARDEN, L.A.; LOWENBERG, B. : Interleukin-6 synergizes with M-CSF in the formation of macrophage colonies for purified human marrow progenitor cells. *Blood*, 1989., **73** : 435.
26. BOWCOCK, A.; KIDD, J.R.; LATHROP, M.; DANESHVAR, L.; MAY, L.T.; RAY, A.; SEHGAL, P.B.; KIDD, K.K.; CAVALLI-SFORZA, L. : The human "interferon- $\beta$ 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin 6" gene : DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics*, 1988, **3** : 8.

27. BRAKENHOFF, J.P.J.; HART, M.; AARDEN, L.A. : Analysis of human IL-6 mutants expressed in *Escherichia coli* : biologic activities are not affected by deletion of aminoacids 1-28. **J. Immunol.**, 1989, **143** : 1175.
28. BREEN, E.C.; REZAI, A.R.; NAKAJIMA, K.; BEALL, G.N.; MITSUYASU, R.T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; MARTINEZ, O. : Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. **J. Immunol.**, 1990, **144** : 480.
29. BRENNER, M.K. : Tumor necrosis factor. **Brit. Jour. Haem.**, 1988, **69** : 149.
30. BROUCKAERT, P.; SPRIGGS, D.R.; DEMETRI, G.; KUFE, D.W.; FIERIS, W. : Circulating interleukin-6 during a continuous infusion of tumor necrosis factor and interferon- $\gamma$ . **J. Exp. Med.**, 1989, **169** : 2257.
31. CALANDRA, T.; GERAIN, J.; HEUMANN, D.; BAUMGARTNER, J.D.; GLAUSER, M.P. : High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock : evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. **Am. J. Med.**, 1991, **91** : 23.
32. CAMPBELL, I.L.; CUTRI, A.; WILSON, A.; HARRISON L.C. : Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic b-cell. **J. Immunol.**, 1989, **143** : 1188.
33. CARMELIET, P.; VANKELECOM, H.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, A.; DENEFF, C. : Release of interleukin-6 from anterior pituitary cell aggregates : developmental pattern and modulation by glucocorticoids and forskolin. **Neuroendocrinology**, 1991, **53** : 29.
34. CARMELIET, P.; BAES, M.; DENEFF, C. : The glucocorticoid hormone dexamethasone reverses the growth hormone-releasing properties of the cholinomimetic carbachol. **Endocrinology**, 1989, **124** : 2625.
35. CASTEL, J.V.; GEIGER, T.; GROSS, V.; ANDUS, T.; WALTER, E.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; HEINRICH, P.C. : Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. **Eur. J. Biochem.**, 1988, **177** : 357.
36. CASTEL, J.V.; GOMEZ-LECHON, M.J.; DAVID, M.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; HEINRICH, P.C. : Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. **FEBS Lett.**, 1988, **232** : 347.
37. CAYPHAS, S.; VAN DAMME, J.; VINK, A.; SIMPSON, J.; BILLIAU, A.; VAN SNICK, J. : Identification of an interleukin HP1-like plasmocytoma growth factor produced by L cells in response to viral infection. **J. Immunol.**, 1987, **139** : 2965.
38. CEUPPENS, J.L.; BAROJA, M.L.; LORRE, K.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, A. : Human T cell activation with PHA : the function of IL-6 as an accessory signal. **J. Immunol.**, 1988, **141** : 3866.
39. CLARK, S.; KAMEN, R. : Human hematopoietic colony-stimulating factors. **Science**, 1987, **236** : 1229.
40. CONTENT, J.; DE WIT, L.; PIERARD, D.; DERYNCK, R.; DE CLERQ, E.; FIERIS, W. : Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon  $\beta$ . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 1982, **79** : 2768.

41. CONTENT, J.; DE WIT, L.; POUPART, P.; OPDENAKKER, G.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, A. : Induction of a 26-kDa protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related leucocyte-derived factor. *Eur. J. Biochem.*, 1985, **152** : 253.
42. COULIE, P.G.; CAYPHAS, S.; VINK, A.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J. : Interleukin-HP 1-related hybridoma and plasmocytoma growth factors induced by lipopolysaccharide in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 1987, **17** : 1217.
43. CROFT, M.; SWAIN, S.L. : B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 4055.
44. CHEN, L.; MORY, Y.; ZILBERSTEIN, A.; REVEL, M. : Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon- $\beta$ 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 8037.
45. CHEN, L.; NOVICK, D.; RUBINSTEIN, M.; REVEL, M. : Recombinant interferon- $\beta$ 2 (interleukin-6) induces myeloid differentiation. *FEBS Lett.*, 1988, **239** : 299.
46. CHEN, W.F.; ZLOTNIK, A. : IL-10 : a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.*, 1991, **147** : 528.
47. CHIU, C.P.; LEE, F. : IL-6 is a differentiation factor for M1 and WEHI-3B myeloid leukemic cells. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 1909.
48. CHIU, C.P.; MOULDS, C.; COFFMAN, R.L.; RENNICK, D.; LEE, F. : Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin-6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 7099.
49. CHIZZONITE, R.; TRUITT, T.; PODLASKI, F.J.; WOLITZKY, A.G.; QUINN, P.M.; NUNES, P.; STERN, A.S.; GATELY, M.K. : IL-12 : monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biological activity on activated human lymphoblast. *J. Immunol.*, 1991, **147** : 1548.
50. DEFILLIPI, P.; POUPART, P.; TAVERNIER, J.; FIERS, W.; CONTENT, J. : Induction and regulation of mRNA encoding 26-KDa protein in human cell lines treated with recombinant human tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 4557.
51. DE MAN, P.; VAN KOOTEN, C.; AARDEN, L.; ENGBERG, I.; LINDER, H.; SVANBORG EDEN, C. : Interleukin-6 induced at mucosal surfaces by gram-negative bacterial infection. *Infect. Immun.*, 1989, **57** : 3383.
52. DEVIERE, J.; CONTENT, J.; CRUSIAUX, A.; DUPONT, E. : IL-6 and TNF $\alpha$  in ascitic fluid during spontaneous bacterial peritonitis. *Digest. Dis. Sci.*, 1991, **36** : 123.
53. DEVIERE, J.; CONTENT, J.; DENYS, C.; VANDERBUSSCHE, P.; SCHANDENE, L.; WYBRAN, J.; DUPONT, E. : High interleukin 6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis : correlation with IgA serum levels and lymphokine production. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989, **77** : 221.
54. DINARELLO, C.A. : Biology of interleukin-1. *FASEB J.*, 1988, **2** : 108.
55. DUMONDE, D.C.; WOLSTENCROFT, R.A.; PANAYI, G.S.; MATTHEW, M.; MORLEY, J.; HOWSON, W.T. : "Lymphokines" : non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature*, 1969, **224** : 38.

56. ELIAS, J.A.; TRINCHIERI, G.; BECK, J.M.; SIMON, P.L.; SEHGAL, P.B.; MAY, L.T.; KERN, J.A. : A synergistic interaction of IL-6 and IL-1 mediates the thymocyte-stimulating activity produced by recombinant IL-1 stimulated fibroblast. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 509.
57. ELIAS, J.A.; LENTZ, V.; CUMMINGS, P.C. : Transforming growth factor-beta regulation of IL-6 production by unstimulated and IL-1-stimulated human fibroblasts. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 3437.
58. EMILIE, D.; CHEVRON, M.C.; AUFFREDOU, M.T.; GALANAUD, P. : Glucocorticoid-dependent synergy between interleukin-1 and interleukin-6 for human B lymphocyte differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 2043.
59. FAUCI, A.S. : The human immunodeficiency virus : infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 1988, **239** : 617.
60. FAZEKAS De ST.GROTH, S.; SCHEIDEGGER, S. : Production of monoclonal antibodies : strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*, 1985, **35** : 1.
61. FERGUSON-SMITH, A.C.; CHEN, Y.F.; NEWMAN, M.S.; MAY, L.T., SEHGAL, P.B.; RUDDLE, F.H. : Regional localization of the interferon  $\beta$ /B cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. *Genomics*, 1988, **2** : 203.
62. FEYEN, J.H.M.; ELFORD, P.; Di PADOVA, F.E.; TRECHSEL, U. : Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J. Bone Mineral Res.*, 1989, **4** : 633.
63. FONG, Y.; MOLDAWER, L.L.; MARANO, M.; WEI, H.; TATTER, S.B.; CLARICK, R.H.; SANTHANAM, U., MAY, L.T., SEHGAL, P.B. : Endotoxemia elicits increased circulating  $\beta$ -2-interferon/interleukin-6 in man. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 2321.
64. FONG, Y.; TRACEY, K.J.; MOLDAWER, L.L.; HESSE, D.G.; MANOGUE, K.B.; KENNEY, J.S.; LEE, A.T.; KUO, G.C.; ALLISON, A.C.; LOWRY, S.F., CERAMI, A. : Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin- $\beta$  and interleukin-6 appearance during lethal bacteremia. *J. Exp. Med.*, 1989, **170** : 1627.
65. FREEMAN, G.J.; FREEDMAN, A.S.; RABINOWE, S.N.; SEGIL, J.M.; HOROWITZ, J.; ROSEN, K.; WHITMAN, J.F.; NADLER, L.M. : Interleukin 6 gene expression in normal and neoplastic B cells. *J. Clin. Invest.*, 1989, **83** : 1512.
66. FREI, K.; LEIST, T.P.; MEAGER, A.; GALLO, P.; LEPPERT, D.; ZINKERNAGEL, R.M.; FONTANA, A. : Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon- $\gamma$  in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients. *J. Exp. Med.*, 1988, **168** : 449.
67. FREI, K.; MALIPIERO, U.V.; LEIST, T.P.; ZINKERNAGEL, R.M.; SCHWAB, M.E.; FONTANA, A. : On the cellular source and function of interleukin-6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur. J. Immunol.*, 1989, **19** : 689
68. FRIEDMAN, R.M.; VOGEL, S.N. : Interferons with special emphasis on the immune system. *Adv. Immunol.*, 1983, **34** : 97.
69. FUKUNAGA M.; FUJIWARA, Y.; FUJIBAYASHI, M.; OCHI, S.; YOKOYAMA, K.; ANDO, A.; HIRANO, T.; UEDA, N.; KAMADA, T. : Signal transduction mechanism of interleukin-6 in cultured rat mesangial cells. *FEBS Lett.*, 1991, **285** : 265.

70. FUJIHASHI, K.; MCGHEE, J.R.; LUE, C.; BEAGLEY, K.W.; TAGA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; MESTECKY, J.; KIYONO, H. : Human appendix B cells naturally express receptors for and respond to interleukin 6 with selective IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub> synthesis. *J. Clin. Invest.*, 1991, **88** : 248.
71. GABRILOVE, J.L. : Introduction and overview of hematopoietic growth factors. *Sem. Hematol.*, 1989, **26** (Supl. 2) : 1.
72. GALLO, P.; FREI, K.; RORDORF, C.; LAZDINS, J.; TAVOLATO, B.; FONTANA, A. : Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of the central nervous system : an elevation of cytokines in cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.*, 1989, **23** : 109.
73. GANAPATHI, M.K.; MAY, L.T.; SCHULTZ, D.; BRABENEC, A.; WEINSTEIN, J.; SEHGAL, P.B.; KUSHNER, I. : Role of interleukin-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **150** : 271.
74. GANTER, U.; STRAUSS, S.; JONAS, U.; WEIDEMANN, A.; BEYREUTHER, K.; VOLK, B.; BERGER, M.; BAUER, J. : Alpha 2-macroglobulin synthesis in IL-6 stimulated human neuronal (SH-SY5Y neuroblastoma) cells. Potential significance for the processing of Alzheimer beta-amiloid precursor protein. *FEBS Lett.*, 1991, **282** : 127.
75. GARCIA-LLORET, M.I.; SANTOS, J.I. : Las citocinas y su papel como mediadores de salud y enfermedad. Nuevos enfoques para viejos problemas. *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.*, 1990, **47** : 797.
76. GARMAN, R.D.; JACOBS, K.A.; CLARK, S.C.; RAULET, D.H. : B cell-stimulatory factor 2 (beta-2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 7629.
77. GATELY, M.K.; DESAI, B.B.; WOLITZKY, A.G.; QUINN, P.M.; DWYER, C.M.; PODLASKY, F.J.; FAMILLETTI, P.C.; SINIGAGLIA, F.; CHIZONNITE, R.; GUBLER, U.; STERN, A.S. : Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.*, 1991, **147** : 874.
78. GAULDIE, J.; NORTHEMANN, W.; FEY, G.H. : IL-6 functions as exocrine hormone in inflammation : hepatocyte undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J. Immunol.*, 1990, **144** : 3804.
79. GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D.; LANSDORP, P.; BAUMANN, H. : Interferon  $\beta$ 2/BSF-2 shares identity with monocyte derived hepatocyte stimulating factor (HSF) and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 7251.
80. GEIGER, T.; ANDUS, T.; KLAPPROTH, J.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; HEINRICH, C. : Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 717.
81. GELIN, J.; MOLDAWER, L.L.; LONNROTH, C.; DE MAN, P.; SUANBORG-EDEN, C.; LOWRY, S.F.; LUNDHOLM K.G. : Appearance of hybridoma growth factor/interleukin-6 in the serum of mice bearing a methylcholanthrene induced sarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **157** : 575.
82. GERMAN, R.D.; JACOBS, K.A.; CLARK, S.C.; RAULET, D.H. : B-cell-stimulatory factor ( $\beta$ 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 7629.

83. GIMBRONE, M.A.; OBIN, M.S.; BROCK, A.F.; LUIS, E.A.; HASS, P.E.; HEBERT, C.A.; YIP, Y.K.; LEUNG, D.W.; LOWE, D.G.; KOHR, W.J.; DARBONNE, W.C.; BECHTOL, K.B.; BAKER, J.B. : Endothelial interleukin-8 : a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*, 1989, **246** : 1601.
84. GROSSMAN, R.M.; KRUEGER, J.; YOURISH, D.; GRANELLI-PIPERNO, P.; MURPHY, D.; MAY, L.T.; SKUPPER, T.; SEHGAL, P.; GOTTLIEB, A.B. : Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86** : 6367.
85. GUERNE, P.A.; ZURAW, B.L.; VAUGHAN, J.H.; CARSON, D.A.; LOTZ, M. : Synovium as a source of interleukin-6 in vitro : contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1989, **83** : 585.
86. HAEGEMAN, G.; CONTENT, J.; VOLCKAERT, G.; DERYNCK, R.; TAVERNIER, J.; FIERS, W. : Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, 1986, **159** : 625.
87. HAGIWARA, T.; SUZUKI, H.; KONO, I.; KASHIWAGI, H.; AKIYAMA, Y.; ONOZAKI, K. : Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes. *Am. J. Pathol.*, 1990, **136** : 39.
88. HAMA, T.; MIYAMOTO, M.; TSUKUI, H.; NISHIO, C.; HATANAKA, H. : Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci. Lett.*, 1989, **104** : 340.
89. HAVELL, E.A.; SEHGAL, P.B. : Tumor necrosis factor independent IL-6 production during murine listeriosis. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 756.
90. HELFGOTT, D.C.; MAY, L.T.; STHOEGER, Z.; TAMM, I.; SHEGAL, P.B. : Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of  $\beta 2$  interferon by human fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1987, **166** : 1300.
91. HELFGOTT, D.C.; TATTER, S.B.; SANTHANAM, U.; CLARICK, R.M.; BHARDWAJ, N.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : Multiple forms of interferon- $\beta 2$ /interleukin-6 in plasma and body fluids during acute bacterial infection. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 948.
92. HELLE, M.; BOEIJE, L.; AARDEN, L.A. : Functional discrimination between interleukin-6 and interleukin-1. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 1535.
93. HELLE, M.; BOEIJE, L.; AARDEN, L.A. : IL-6 is an intermediate in IL-1 induced thymocyte proliferation. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 4335.
94. HELLE, M.; BRAKENHOFF, J.P.J.; DE GROOT, E.R.; AARDEN, L.A. : Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 957.
95. HIBI, M.; MURAKAMI, M.; SAITO, M.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. : Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp 130. *Cell*, 1990, **63** : 1149.
96. HILL, R.J.; LEVEN, R.M.; LEVIN, F.C.; LEVIN, J. : The effect of partially purified thrombopoietin on ginea pig megakaryocyte ploidy in vitro. *Experimental Hematology*, 1989, **17** : 903.

97. HIRANO, T.; YASUKAWA, K.; HARADA, H.; TAGA, T.; WATANABE, Y.; MATSUDA, T.; KASHIWAMURA, S.; NAKAJIMA, K.; KOYAMA, K.; IWAMATSU, A.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; MATSUI, H.; TAKAHARA, Y.; TANIGUCHI, T.; KISHIMOTO, T. : Complementary DNA for a novel interleukin that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 1986, **324** : 73.
98. HIRANO, T.; TAGA, T.; NAKANO, N.; YASUKAWA, K.; KASHIWAMURA, S.; SHIMIZU, K.; NAKAJIMA, K.; PYUN, K.H.; KISHIMOTO, T. : Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, **82** : 5490.
99. HIRANO, T.; TAGA, T.; YASUKAWA, K.; NAKAJIMA, K.; NAKANO, N.; TAKATSUKI, F.; SHIMIZU, M.; MURASHIMA, A.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; KISHIMOTO, T. : Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 228.
100. HIRANO, T.; TERANISHI, T.; LIN, B.; ONOUE, K. : Human helper T cell factor(s). IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on *Staphylococcus aureus* Cowan I-stimulated B cells. *J. Immunol.*, 1984, **133** : 798.
101. HIRANO, T.; MATSUDA, T.; HOSOI, K.; OKANO, A.; MATSUI, H.; KISHIMOTO, T. : Absence of antiviral activity in recombinant B cell stimulatory factor 2 (BSF-2). *Immunol. Lett.*, 1988, **17** : 41.
102. HIRANO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. : Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol. Today*, 1990, **11** : 443.
103. HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TURNER, M.; MIYASAKA, N.; BUCHAM, G.; TANG, B.; SATO, K.; SHIMIZU, M.; MAINI, R.; FELDMANN, M.; KISHIMOTO, T. : Excessive production of interleukin-6/B-cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 1792.
104. HIRATA, Y.; TAGA, T.; HIBI, M.; NAKANO, N.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 2900.
105. HIROHATA, S.; MIYAMOTO, T. : Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum.*, 1990, **33** : 644.
106. HISCOTT, J.; ALPER, D.; COHEN, L.; LEBLANC, J.F.; SPORTZA, L.; WONG, A.; XANTHOUDAKIS, S. : Induction of human b interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-KB site of the human immunodeficiency virus enhancer. *J. Virol.*, 1989, **63** : 2557.
107. HOANG, T.; HAMAN, A.; GONCALVEZ, O.; WONG, G.; CLARK, S.C. : Interleukin-6 enhances growth factor dependent proliferation of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 1988, **72** : 823.
108. HODGKIN, P.D.; BOND, M.W.; O'GARRA, A.; FRANK, G.; LEE, F.; COFFMAN, R.L.; ZLOTNIK, A.; HOWARD, M. : Identification of IL-6 as a T cell-derived factor that enhances the proliferative response of thymocytes to IL-4 and phorbol myristate acetate. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 151.



109. HOLSTI, M.A.; RAULET, D.H. : IL-6 and IL-1 synergize to stimulate IL-2 production and proliferation of peripheral T cells. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 2514.
110. HONDA, M.; KITAMURA, K.; MIZUTANI, Y.; OISHI, M.; ARAI, M.; OKURA, T.; IGARAH, K.; YASUKAWA, K.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; MITSUYASU, R.; CHERMANN, J.C.; TOKUNAGA, T. : Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2R in HIV-induced diseases. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 4059.
111. HORII, Y.; MURAGUCHI, A.; IWANO, M.; MATSUDA, T.; HIRAYAMA, T.; YAMADA, H.; FUJII, Y.; DOHI, K.; ISHIKAWA, H.; OHMOTO, Y.; YOSHIZAKI, K.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 3949.
112. HORII, Y.; MURAGUCHI, A.; SUEMATSU, S.; MATSUDA, T.; YOSHIZAKI, K.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells : macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 1529.
113. HOPKINS, S.J.; ROTHWELL, N.J. : Further functions of IL-6. *Immunol. Today*, 1991, **12** : 170.
114. HOUSSIAU, F.A.; COULIE, P.G.; OLIVE, D.; VAN SNICK, J. : Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 653.
115. HOUSSIAU, F.A.; BUKASSA, K.; SINDIC, C.J.M.; VAN DAMME, J.; VAN SNICK, J. : Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin-6) in cerebro spinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, **71** : 320.
116. HOUSSIAU, F.A.; COULIE, P.G.; VAN SNICK, J. : Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 2520.
117. HOUSSIAU, F.A.; DEVOGELAER, J.P.; VAN DAMME, J.; NAGANT DE DEUXCHAISNES, C.; VAN SNICK, J. : Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.*, 1988, **31** : 784.
118. IKEBUCHI, K.; WONG, G.G.; CLARK, S.C.; IHLE, J.N.; HIRAI, Y.; OGAWA, M. : Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 9035.
119. ISHIBASHI, T.; KIMURA, H.; UCHIDA, T.; KARIYONE, S.; FRIESE, P.; BURSTEIN, A. : Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86** : 5953.
120. ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; JIN, C.H.; AKATSU, T.; ABE, E.; NAKAMURA, A.; YAMAGUCHI, A.; YOSHIKI, S.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; SUADA, T. : IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 3297.
121. ISSHIKI, H.; AKIRA, S.; TANABE, O.; NAKAJIMA, T.; SHIMAMOTO, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Constitutive and interleukin-1 (IL-1) inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol. Cell Biol.*, 1990, **10** : 2577.
122. JABLONS, D.M.; MULE, J.J.; McINTOSCH, J.K.; SEHGAL, P.B.; MAY, L.T.; HUANG, C.M.; ROSENBERG, S.A.; LOTZE, M.T. : IL-6/IFN $\beta$ -2 as a circulating hormone : induction by cytokine administration in humans. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 1542.

123. JELINEK, D.F.; LIPSKY, P.E. : Comparative activation requirements of human peripheral blood, spleen, and lymph node B cells. *J. Immunol.*, 1987, **139** : 1005.
124. JIANG, Z.; WODA, B.A. : Cytokine gene expression in the islets of the diabetic biobreeding/worcester rat. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 2990.
125. JIRIK, F.R.; PODOR, T.J.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; LOSKUTOFF, D.J.; CARSON, D.A.; LOTZ, M. : Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 144.
126. JOSEFSEN, K.; BUSCHARD, K.; AAEN, K.; HORN, T.; DAMME, J.; BENDTZEN, K. : Interleukin-6 is an endogenous modulator of B-cell structure and function. *Diabetologia*, 1989, **32** : 501A.
127. JUDD, A.M.; SPANGELO, B.L.; MACLEOD, R.M. : Rat adrenal zona glomerulosa produce interleukin-6. *Prog. Neuroendocrinimmunol.*, 1990, **3** : 282.
128. KATZ, Y.; COLE, F.S.; STRUNK R.C. : Synergism between IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide for synthesis of Factor B but not C2 in human fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1988, **167** : 1.
129. KAWANO, M.; HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TAGA, T.; HORII, Y.; IWATO, K.; ASAOKU, H.; TANG, B.; TANABE, O.; TANAKA, H.; KURAMOTO, A.; KISHIMOTO, T. : Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, 1988, **332** : 83.
130. KERN, P.; HEMMER, C.J.; VAN DAMME, J.; GRUSS, H.J.; DIETRICH, M. : Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. *Am. J. Med.*, 1989, **87** : 139.
131. KIRNBAUER, R.; KOCK, A.; SCHWARZ, T.; URBANSKI, A.; KRUTMANN, J.; BORTH, W.; DAMM, D.; SHIPLEY, G.; ANSEL, J.C.; LUGER, T.A. : IFN- $\beta$ 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 1922.
132. KISHIMOTO, T. : The biology of interleukin-6. *Blood*, 1989, **74** : 1.
133. KISHIMOTO, T.; HIRANO, T. : Molecular regulation of B lymphocyte response. *Ann. Rev. Immunol.*, 1988, **6** : 485.
134. KLASHMAN, D.J.; MARTIN, R.A.; MARTINEZ-MAZA, O.; STEVENS, R.H. : *In vitro* regulation of B cell differentiation by interleukin-6 and soluble CD23 in systemic lupus erythematosus B cell subpopulations and antigen-induced normal B cells. *Arthritis Rheum.*, 1991, **34** : 6.
135. KLEIN, B.; ZHANG, X.G.; JOURDAN, M.; CONTENT, J.; HOUSSIAN, F.; AARDEN, L.; PIECHACZYK, M.; BATAILLE, R. : Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989, **73** : 517.
136. KLEIN, B.; WIJDENES, J.; ZHANG, X.G.; JOURDAN, M.; BOIRON, J.M.; BROCHIER, J.; LIAUTARD, J.; MERLIN, M.; CLEMENT, C.; FOURNIER, M.B.; LU, Z.Y.; MANNONI, P.; SANY, J.; BATAILLE, R. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood*, 1991, **78** : 1198.

137. KOHASE, M.; HENRIKSEN-DISTEFANO, L.T.; MAY, L.T.; VILCEK, J.; SEHGAL, P.B. : Induction of interferon- $\beta$ 2 by tumor necrosis factor : a homeostatic mechanism in the regulation of cell proliferation. *Cell*, 1986, **45** : 659.
138. KOHASE, M.; MAY, L.T.; TAMM, I.; VILCEK, J.; SEHGAL, P.B. : A cytokine network in human fibroblasts : interactions of  $\beta$ -interferons, tumor necrosis factor, platelet derived growth factor, and interleukin-1. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7** : 273.
139. KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificities. *Nature*, 1975, **256** : 495.
140. KOIKE, K.; NAKAHATA, T.; TAKAGI, M.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, A.; TSUJI, K.; NAGANUMA, K.; OKANO, A.; AKIYAMA, Y.; AKABANE, T. : Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum free culture. *J. Exp. Med.*, 1988, **168** : 879.
141. KOJ, A.; GAULDIE, J.; REGOECZI, E.; SAUDER, D.N.; SWEENEY, G.D. : The acute-phase response of cultured rat hepatocytes : system characterization and the effect of human cytokines. *Biochem. J.*, 1984, **224** : 505.
142. KREITMAN, R.J.; SIEGALL, B.C.; FITZGERALD, P.J.D.; EPSTEIN, J.; BARLOGIE, B.; PASTAN, I. : Interleukin-6 fused to a mutant form of Pseudomonas exotoxin kills malignant cells from patients with multiple myeloma. *Blood*, 1992, **79** : 1775.
143. KRUTMANN, J.; KIRNBAUER, R.; KOCK, A.; SCHWARTZ, T.; SCHOPF, E.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B.; LUGER, T.A. : Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production : role in anti-CD3 induced T cell activation. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 1342.
144. KUHWEIDE, R.; VAN DAMME, J.; LORRE, K.; BAROJA, M.L.; TSUDO, M.; CEUPPENS, J.L. : Accessory cell-derived helper signals in human cell activation with PHA : induction of IL-2-responsiveness by IL-6 and of IL-2 production by IL-1. *Cytokine*, 1990, **2** : 45.
145. KUNDZ, D.; ZIMMERMANN, R.; HEISIG, M.; HEINRICH, P.C. : Identification of the promoter sequences involved in the interleukin-6 dependent expression of the rat  $\alpha$ 2-macroglobulin gene. *Nucl. Acid. Res.*, 1989, **17** : 1121.
146. KURIHARA, N.; BERTOLINI, D.; SUDA, T.; AKIYAMA, Y.; ROODMAN, G.D. : Interleukin-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J. Immunol.*, 1990, **144** : 4226.
147. LANSER, M.E.; BROWN, G.E. : Stimulation of rat hepatocyte fibronectin production by monocyte conditioned medium is due to interleukin 6. *J. Exp. Med.*, 1989, **170** : 1781.
148. LE, J.; FREDRICKSON, G.; REIS, L.F.L.; DIAMANSTEIN, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; VILCEK, J. : IL-2-dependent and IL-2-independent pathways of regulation of thymocyte function by IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 8643.
149. LE, P.T.; LAZORICK, S.; WHICHARD, L.P.; YANG, Y.C.; CLARK, S.C.; HAYNES, B.F.; SINGER, K.H. : Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 3310.
150. LE, J.; VILCEK, J. : Interleukin 6 : a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab. Invest.*, 1989, **61** : 588.

151. LEARY, A.G.; IKEBUCHI, K.; HIRAI, Y.; WONG, G.G.; YANG, Y.C.; CLARK, S.C.; OGAWA, M. : Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells : comparison with interleukin-1. **Blood**, 1988, **71** : 1759.
152. LEE, T.Y.; KOO, A.S.; PEYRET, C.; SHIMABUKURO, T.; DEKERNION, J.B.; BELLDEGRUN, A. : The effect of interleukin-6 on tumor infiltrating lymphocytes derived from human renal cell cancer. **J. Urology**, 1991, **145** : 663.
153. LENARDO, M.J.; FAN, C.M.; MANIATIS, T.; BALTIMORE, D. : The involvement of NF- $\kappa$ B in  $\beta$ -interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. **Cell**, 1989, **57** : 287.
154. LEVEN, R.M.; RODRIGUEZ, A. : Immunomagnetic bead isolation of megakaryocytes from guinea-pig bone marrow : effect of recombinant interleukin-6 on size, ploidy and cytoplasmic fragmentation. **Brit. J. Haematol.**, 1991, **77** : 267.
155. LEVY, Y.; TSAPIS, A.; BROUET, J.C. : Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. **J. Clin. Invest.**, 1991, **88** : 696.
156. LIBERMANN, T.A.; BALTIMORE, D. : Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor. **Mol. Cell. Biol.**, 1990, **10** : 2327.
157. LIEBERMAN, A.P.; PITHA, P.M.; SHIN, H.S.; SHIN, M.L. : Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1989, **86** : 6348.
158. LINKER-ISRAELI, M.; DEANS, R.J.; WALLACE, D.J.; PREHN, J.; OZERI-CHEN, T.; KLINENBERG, J.R. : Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. **J. Immunol.**, 1991, **147** : 117.
159. LINKER-ISRAELI, M.; QUISMORIO, F.P. Jr.; HORWITZ, D.A. : CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support auto-antibody synthesis. **Arthritis Rheum.**, 1990, **33** : 1216.
160. LOPPNOW, H.; LIBBY, P. : Proliferating or interleukin-1 activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin-6. **J. Clin. Invest.**, 1990, **85** : 731.
161. LORD, K.A. : LIF and IL-6 trigger the same immediate early response; including tyrosine phosphorylation, upon induction of myeloid leukemia differentiation. **Mol. Cell. Biol.**, 1991, **11** : 4371.
162. LORRE, K.; VAN DAMME, J.; VERWILGHEN, J.; BAROJA, M.L.; CEUPPENS, J.L. : IL-6 is an accessory signal in the alternative CD2-mediated pathway of T cell activation. **J. Immunol.**, 1990, **144** : 4681.
163. LOTEM, J.; SHABO, Y.; SACHS, L. : Regulation of megakaryocyte development by interleukin-6. **Blood**, 1989, **74** : 1545.
164. LOTZ, M.; JIRIK, F.; KABOURIDIS, P.; TSOUKAS, C.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; CARSON, D.A. : B cell stimulating factor-2/interleukin-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, 1988, **167** : 1253.

165. LOTZ, M.; VAUGHAN, J.H.; CARSON, D.A. : Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 1988, **241** : 1218.
166. LOWIK, C.W.G.M.; VAN DER PLUUM, G.; BLOYS, S.; HOEKMAN, K.; BIVOET, O.L.M.; AARDEN, L.A.; PAPAPOULOS, S.E. : Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells : a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **162** : 1546.
167. LUGER, A.T.; KRUTMANN, J.; KIRNBAUER, R.; URBANSKI, A.; SCHWARZ, T.; KLAPPACHER, G.; KOECH, A.; MICKSCHE, M.; MALEJCZYK, J.; SCHAUER, E.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : IFN- $\beta$ /IL-6 augments the activity of human natural killer cells. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 1206.
168. MacNEIL, I.A.; SUDA, T.; MOORE, K.W.; MOSMANN, T.R.; ZLOTNIK, A. : IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 4167.
169. MARINKOVIC, S.; JAHREIS, G.P.; WONG, G.G.; BAUMANN, H. : IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 808.
170. MARTINEZ-MAZA, O.; BEREK, J. : Interleukin 6 and cancer treatment. *In vivo*, 1991, **5** : 583.
171. MASUHIRO, K.; MATSUZAKI, N.; NISHINO, E.; TANIGUCHI, T.; KAMEDA, T.; LI, Y.; SAJI, F.; TANIZAWA, O. : Trophoblast-derived interleukin-1 (IL-1) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6-receptor system in first trimester human trophoblasts. *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 1991, **72** : 594.
172. MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Establishment of an interleukin 6 (IL-6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 951.
173. MATSUDA, T.; SUEMATSU, S.; KAWANO, M.; YOSHIZAKI, K.; TANG, B.; TANABE, O.; NAKAJIMA, T.; AKIRA, S.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : IL-6/BSF-2 in normal and abnormal regulation of immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1989, **557** : 466.
174. MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Identification of  $\alpha$ 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *Immunol.*, 1989, **142** : 148.
175. MATSUGUCHI, T.; OKAMURA, S.; KAWASAKI, C.; NIHO, Y. : Production of interleukin 6 from human liver cell lines : production of interleukin 6 is not concurrent with the production of  $\alpha$ -fetoprotein. *Cancer Res.*, 1990, **50** : 7457.
176. MAY, L.T.; HELFGOTT, D.C.; SEHGAL, P.B. : Anti- $\beta$  interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts : structural studies of the  $\beta$ 2-interferon involved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83** : 8957.
177. MAY, L.T.; GHAYEB, J.; SANTHANAM, U.; TATTER, S.B.; STHOEGER, Z.; HELFGOTT, D.C.; CHIORAZZI, N.; GRIENINGER, G.; SEHGAL, P.B. : Synthesis and secretion of multiple forms of  $\beta$ 2-interferon/B-cell differentiation factor-2/hepatocyte stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** : 7760.
178. MAY, L.T.; SANTHANAM, U.; TATTER, S.B.; BHARDWAJ, N.; GHAYEB, J.; SEHGAL, P.B. : Phosphorylation of secreted forms of human  $\beta$ 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **152** : 1144.

179. MAYANI, V.H. : Factores de crecimiento hematopoyéticos. *Ciencia y Desarrollo*, 1990, **16** (92) : 29.
180. McINTOSH, J.K.; JABLONS; D.M.; MULE, J.J.; NORDAN, R.P.; RUDIKOFF, S.; LOTZE, M.T.; ROSENBERG, S.A. : *In vivo* induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of de novo serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 162.
181. McKENZIE, D. : Alloantigen presentation by B cells. Requirement for IL-1 and IL-6. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 2907.
182. MENGOZZI, M.; SIRONI, M.; GADINA, M.; GHEZZI, P. : Reversal of defective IL-6 production in lipopolysaccharide-tolerant mice by phorbol myristate acetate. *J. Immunol.*, 1991, **147** : 899.
183. METCALF, D. : Molecular biology and functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, 1986, **67** : 257.
184. MEYERS, F.J.; GUMERLOCK, P.H.; KAWASAKI, E.S.; WANG, A.M.; de VERE WHITE, R.W.; ERLICH, H.A. : Human leukocyte antigen II, interleukin-6, and interleukin-6 receptor expression determined by the polymerase chain reaction. *Cancer*, 1991, **67** : 2087.
185. MIKI, S.; IWANO, M.; MIKI, Y.; YAMAMOTO, M.; TANG, B.; YOKOKAWA, K.; SONODA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Interleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett.*, 1989, **250** : 607.
186. MILES, S.A.; REZAI, A.R.; SALAZAR-GONZALEZ, J.F.; VANDER MEYDEN, M.; STEVENS, R.H.; LOGAN, D.M.; MITSUYASU, R.T.; TAGA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; MARTINEZ-MAZA, O. : AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87** : 4068.
187. MIYAURA, C.; ONOZAKI, K.; AKIYAMA, Y.; TANIYAMA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; SUDA, T. : Recombinant human interleukin-6 (B cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1). *FEBS Lett.*, 1988, **234** : 17.
188. MIYAURA, C.; JIN, C.H.; YAMAGUCHI, Y.; TOMIDA, M.; HOZUMI, M.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; SUDA, T. : Production of interleukin-6 and its relation to the macrophage differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1) treated with differentiation-inducing factor and  $1\alpha,25$ -dihydroxvitamin  $D_3$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **158** : 660.
189. MOCK, B.A.; NORDAN, R.P.; JUSTICE, M.J.; KOSAK, C.; JENKINS, N.A.; COPERLAND, N.G.; CLARK, S.C.; WONG, G.C.; RUDIKOFF, S. : The murine IL-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 1372.
190. MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. : Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 1990, **248** : 1230.
191. MORINAGA, Y.; SUZUKI, H.; TAKATSUKI, F.; AKIYAMA, Y.; TANIYAMA, T.; MATSUSHIMA, K.; ONOZAKI, K. : Contribution of IL-6 to the antiproliferative effect of IL-1 and tumor necrosis factor on tumor cell lines. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 3538.

192. MORRONE, G.; CILIBERTO, G.; OLIVIERO, S.; ARCONI, R.; DENTE, L.; CONTENT, J.; CORTESI, R. : Recombinant interleukin 6 regulates the transcriptional activation of a set of human acute phase genes. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** : 12554.
193. MOSKOPHIDIS, D.; FREI, K.; LOHLER, J.; FONTANA, A.; ZINKERNAGEL, R.M. : Production of random classes of immunoglobulins in brain tissue during persistent viral infection paralleled by secretion of interleukin-6 (IL-6) but not IL-4, IL-5, and gamma interferon. *J. Virology*, 1991, **65** : 1364.
194. MOSHAGE, H.J.; ROELOFS, H.M.J.; VAN PELT, J.F.; HAZENBERG, B.P.C.; VAN LEEUWEN, M.A.; LIMBURG, P.C.; AARDEN, L.A.; YAP, S.H. : The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1988, **155** : 112.
195. MOTRO, B.; ITIN, A.; SACHS, L.; KESHET, E. : Pattern of interleukin-6 gene expression *in vivo* suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87** : 3092.
196. MULE, J.J.; McINTOSH, J.K.; JABLONS, D.J.; ROSENBERG, S.A. : Antitumor activity of recombinant interleukin-6 in mice. *J. Exp. Med.*, 1990, **171** : 629.
197. MULLER, K. : Inhibition of production and function of IL-6 by 1,25-dihydroxivitamin D<sub>3</sub>. *Immunol. Lett.*, 1991, **28** : 115.
198. MURAGUCHI, A.; KISHIMOTO, T.; MIKI, Y.; KURITANI, Y.; KAIEDA, T.; YOSHOZAKI, K.; YAMAMURA, Y. : T-cell-replacing factor (TRF)-induced IgG secretion in human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J. Immunol.*, 1981, **127** : 412.
199. MURAGUCHI, A.; HIRANO, T.; TANG, B.; MATSUDA, T.; HORII, Y.; NAKAJIMA, K.; KISHIMOTO, T. : The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.*, 1988, **167** : 332.
200. NAITOH, Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, H. : Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **155** : 1459.
201. NAKAJIMA, K.; MARTINEZ-MAZA, O.; HIRANO, T.; BREEN, E.C.; NISHANIAN, P.G.; SALAZAR-GONZALEZ, J.F.; FAHEY, J.L.; KISHIMOTO, T. : Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-β2) production by HIV. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 531.
202. NAVAB, M.; LIAO, F.; HOUGH, G.P.; ROSS, L.A.; VAN LENTEN, B.J.; RAJAVASHISTH, T.B.; LUSIS, A.J.; LAKS, H.; DRINKWATER, D.C.; FOGELMAN, A.M. : Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin 43 message. *J. Clin. Invest.*, 1991, **87** : 1763.
203. NAVARRO, S.; DEBILI, N.; BERNAUDIN, J.F.; VAINCHENKER, W.; DOLY, J. : Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 4339.
204. NECKERS, L.M.; NORDAN, R.P. : Regulation of murine plasmacytoma transferrin receptor expression and G<sub>1</sub> traversal by plasmacytoma cell growth factor. *J. Cell Physiol.*, 1988, **135** : 495.

205. NIETFELD, J.J.; WILBRINK, B.; HELLE, M.; VAN ROY, J.L.A.M.; DEN OTTER, W.; SWAAK, A.J.G.; HUBER-BRUNING, O. : Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, 1990, **33** : 1695.
206. NIJSTEN, A.W.N.; GROOT, E.R.; TEN DUIS, H.J.; KLASSEN, H.J.; HACK, C.E.; AARDEN, L.A. : Serum levels of interleukin-6 and acute phase response. **Lancet**, 1987, **2** : 921.
207. NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; TAGOH, H.; MONDEN, M.; KISHIMOTO, S.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 1989, **50** : 399.
208. NISHINO, E.; MATSUZAKI, N.; MASUHIRO, K.; KAMEDA, T.; TANIGUCHI, T.; TAKAGI, T.; SAJI, F.; TANIZAWA, O. : Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. **J. Clin. Endocrin. Metabol.**, 1990, **71** : 436.
209. NORDAN, R.P.; POTTER, M. : A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation *in vitro*. **Science**, 1986, **233** : 566.
210. NORDAN, R.P.; PUMPHREY, J.G.; RUDIKOFF, S. : Purification and NH-terminal sequence of a plasmacytoma 2 growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. **J. Immunol.**, 1987, **139** : 813.
211. NORIOKA, K.; HARA, M.; HARIGAI, M.; KITANI, A.; HIROSE, T.; SUZUKI, K.; KAWAKAMI, M.; TABATA, H.; KAWAGOE, M.; NAKAMURA, H. : Production of B cell stimulatory factor 2/interleukin 6 activity by human endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1988, **153** : 1045.
212. O'GARRA, A. : Interleukins and the immune system. **Lancet**, 1989, **1** : 943.
213. OHASHI, T.; GOITSUKA, R.; ONO, K.; HASEGAWA, A. : Feline hybridoma growth factor/interleukin-6 activity. **J. Leuk. Biol.**, 1989, **46** : 501.
214. OKADA, M.; KITAHARA, M.; KISHIMOTO, S.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. **J. Immunol.**, 1988, **141** : 1543.
215. OLD, L.J. : Tumor necrosis factor. **Science**, 1985, **230** : 630.
216. OLIVIERO, S.; CORTESE, R. : The human haptoglobin gene promoter : interleukin-6 responsive elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6. **EMBO J.**, 1989, **8** : 1145.
217. ONOZAKI, K.; AKIYAMA, Y.; OKANO, A.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; HASHIMOTO, T.; YOSHIZAWA, K.; TANIYAMA, T. : Synergistic regulatory effects of BSF-2/IL-6 and IL-1 on the growth and differentiation of human and mouse myeloid leukemic cell lines into macrophage-like cells. **Lymphokine Res.**, 1988, **7** : 304.
218. OXHOLM, A.; OXHOLM, P.; PERMIN, H.; BENDTZEN, K. : Epidermal tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 6-like activities in AIDS-related Kaposi's sarcoma : an immunohistological study. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, 1989, **97** : 533.



219. PAUL, N.L.; RUDDLE, N.H. : Lymphotoxin. *Ann. Rev. Immunol.*, 1988, **6** : 407.
220. PERLMUTTER, D.H.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : Interferon- $\beta$ /interleukin-6 modulates synthesis of  $\alpha$ 1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84** : 138.
221. PHILIP, R.; EPSTEIN L.B. : Tumor necrosis factor as immuno-modulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself,  $\gamma$  interferon and interleukin 1. *Nature*, 1986, **326** : 86.
222. PIED, S.; RÉNIA, L.; NUSSLER, A.; MILTGEN, F.; MAZIER, D. : Inhibitory activity of IL-6 on malaria hepatic stages. *Parasite Immunol.*, 1991, **13** : 211.
223. POCKLEY, A.G.; MONTGOMERY, P.C. : *In vivo* adjuvant effect of interleukins 5 and 6 on rat tear IgA antibody response. *Immunology*, 1991, **73** : 19.
224. POLI, V.; MANCINI, F.P.; CORTESE, R. : IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, 1990, **63** : 643.
225. POLI, G.; BRESSLER, P.; KINTER, A.; DUH, E.; TIMMER, W.C.; RABSON, A.; JUSTEMENT, J.S.; STANLEY, S.; FAUCI, A.S. : Interleukin-6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with TNF- $\alpha$  by transcriptional and postranscriptional mechanisms. *J. Exp. Med.*, 1990, **172** : 151.
226. POTTER, M.; BOYCE, C. : Induction of plasma cell neoplasms in strain Balb/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature*, 1962, **193** : 1086.
227. POUPART, P.; VANDENABEELE, P.; CAYPHAS, S.; SNICK, J.V.; HAEGEMANN, G.; KRUYSS, V.; FIERIS, W.; CONTENT, J. : B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN- $\beta$ 2, HPGF). *EMBO J.*, 1987, **6** : 1219.
228. PROWSE, K.R.; BAUMANN, H. : Hepatocyte-stimulating factor,  $\beta$ 2 interferon, and interleukin-1 enhance expression of the rat  $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene via a distal upstream regulatory region. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, **8** : 42.
229. RAMADORI, G.; VAN DAMME, J.; RIEDER, H.; MEYER, K.H. : Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 1259.
230. RAY, A.; TATTER, S.B.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : Activation of the human " $\beta$ 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 6701.
231. RAY, A.; SASSONE CORSI, P.; SEHGAL, P.B. : A multiple cytokine- and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene : similarities with c-fos gene regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, **9** : 5537.
232. RAY, A.; TATTER, S.B.; SANTHANAM, U.; HELFGOTT, D.C.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : Regulation of expression of interleukin-6 : molecular and clinical studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1989, **557** : 353.

233. RAYNALD, M.C.; LIU, Z.Y.; HIRANO, T.; MAYER, L.; KISHIMOTO, T.; CHEN KIANG, S. : Interleukin 6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86** : 8024.
234. RENAULD, J.C.; VINK, A.; VAN SNICK, J. : Accessory signals in murine cytolytic T cell responses. Dual requirement for IL-1 and IL-6. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 1894.
235. REVEL, M. : Host defense against infections and inflammation : role of the multifunctional IL-6/INF- $\beta$ 2 cytokine. *Experientia*, 1989, **45** : 549.
236. REVEL, M.; ZILBERSTEIN, A.; RUGGIERI, R.; CHEN, L.; MORY, Y.; RUBINSTEIN, M.; MICHALEVICZ, R. : Human IFN-beta-2 : A cytokine with multiple functions in infections and inflammation. In : *Monokines and other non-lymphocytic cytokines. Progress in Leukocyte Biology*. vol. 8. Eds. M.C. Pawanda; J.J. Oppenheim; M.J. Kluger and C.A. Dinarello. Alan R. Liss. New York, 1988. : 21.
237. REVEL, M.; ZILBERSTEIN, A.; RUGGIERI, R.; RUBINSTEIN, M.; CHEN, L. : Autocrine interferons and interferon  $\beta$ 2. *J. Interferon Res.*, 1987, **7** : 529.
238. RIGHI, M.; MORI, L.; DE LIBERO, G.; SIRONI, M.; BIONDI, A.; MANTOVANI, A.; DENIS-DONINI, S.; RICCARDI-CASTAGNOLI, P. : Monokine production by microglial cell clones. *Eur. J. Immunol.*, 1989, **19** : 1443.
239. RITCHIE, D.G.; FULLER, G.M. : Hepatocyte-stimulating factor : a monocyte-derived acute-phase regulatory protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1983, **408** : 490.
240. ROODMAN, D.G.; KURIHARA, N.; OHSAKI, Y.; KUKITA, A.; HOSKING, D.; DEMULDER, A.; SMITH, F.J.; SINGER, R.F. : Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest.*, 1992, **89** : 46.
241. RUOSLATHI, E. : Integrins. *J. Clin. Invest.*, 1991, **87** : 1.
242. SABOURIN, L.A.; HAWLEY, R.G. : Suppression of programmed death and G<sub>1</sub> arrest in B-cell hybridomas by interleukin-6 is not accompanied by altered expression of immediate early response genes. *J. Cell. Physiol.*, 1990, **145** : 564.
243. SACHS, L. : The molecular control of blood cell development. *Science*, 1987, **238** : 1374.
244. SANCEAU, J.; BERANGER, F.; GAUDELET, C.; WIETZERBIN, J. : Interferon- $\gamma$  is an essential cosignal for triggering IFN- $\beta$ 2/BSF-2/IL-6 gene expression in human monocytic cell lines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1990, **557** : 130.
245. SANCEAU, J.; WIJDENES, J.; REVEL, M.; WIETZERBIN, J. : IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human monocytic cell line (THP-1). *J. Immunol.*, 1991, **147** : 2630.
246. SANDLER, S.; BENDTZEN, K.; EIZIRIK, D.L.; WELSH, M. : Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets *in vitro*. *Endocrinology*, 1990, **126** : 1288.
247. SATOH, T.; NAKAMURA, S.; TAGA, T.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; KAZIRO, Y. : Induction of neural differentiation in PC12 cells by B cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, **8** : 3546.

248. SAWADA, T.; TSUDA, H.; TAKATSUKI, K. : Spontaneous production of interleukin 6 by adult T-cell leukaemia cells. *Brit. J. Cancer*, 1990, **62** : 923.
249. SCALA, G.; QUINTO, I.; RUOCCO, M.R.; ARCUCCI, A.; MALLARDO, M.; CARETTO, P.; FORNI, G.; VENUTA, S. : Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and *in vivo* tumorigenicity. *J. Exp. Med.*, 1990, **172**, 1: 61.
250. SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S.C.; DINARELLO, C.A. : Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells : IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, 1990, **75** (Supl. 1) : 40.
251. SCHNITTMAN, S.M.; SINGER, K.H.; GREENHOUSE, J.J.; STANLEY, S.K.; WHICHARD, L.P.; HAYNES, B.F.; FAUCI, A.S. : Thymic microenvironment induces HIV expression. Physiologic secretion of IL-6 by thymic epithelial cells up-regulates virus expression in chronically infected cells. *J. Immunol.*, 1991, **147** : 2553.
252. SCHRADER, J.W.; MOYER, C.; ZILTENER, H.J.; REINISCH, C.L. : Release of the cytokines colony-stimulating factor-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and IL-6 by cloned murine vascular smooth muscle cells. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 3799.
253. SECKINGER, P.; YARON, I.; MEYER, F.A.; YARON, M.; DAYER, J.M. : Modulation of the effects of interleukin-1 on glycosaminoglycan synthesis by the urine-derived interleukin-1 inhibitor, but not by interleukin-6. *Arthritis Rheum.*, 1990, **33** : 1807.
254. SCREPANTI, I.; MECO, D.; SCARPA, S.; MORRONE, S.; FRATI, L.; GULINO, A.; MODESTI A. : Neuromodulatory loop mediated by nerve growth factor and interleukin 6 in thymic stromal cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, **89** : 3209.
255. SEHGAL, P.B.; ZILBERSTEIN, A.; RUGGIERI, R.M.; MAY, L.T.; FERGUSON-SMITH, A.; LATE, D.L.; REVEL, M.; RUDDLE, F.M. : Human chromosome 7 carries the  $\beta 2$  interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 3633.
256. SEHGAL, P.B.; MAY, L.T.; TAMM, I.; VILCEK, J. : Human  $\beta 2$ -interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science*, 1987, **235** : 731.
257. SEHGAL, P.B.; WALTHER, Z.; TAMM, I. : Rapid enhancement of  $\beta 2$ -interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 3663.
258. SEHGAL, P.B.; HELFGOTT, D.C.; SANTHANAM, U.; TATTER, S.B.; CLARICK, R.H.; GHRAYEB, J.; MAY, L.T. : Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease : enhanced expression of the  $\beta 2$ -interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1988, **167** : 1951.
259. SEHGAL, P.B.; GRIENINGER, G.; TOSATO, G. : Regulation of the acute phase and immune response : interleukin-6. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1989, **557** : 1.
260. SEHGAL, P.B. : Interleukin-6 in infection and cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1990, **195** : 183.

261. SHABO, Y.; LOTEY, J.; SACH, L. : Autoregulation of interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in the differentiation of myeloid leukemia cells. *Mol. Cell Biol.*, 1989, **9** : 4109.
262. SHALABY, M.R.; WAAGE, A.; AARDEN, L.; ESPEVIK, T. : Endotoxin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1 induce interleukin-6 production *in vivo*. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1989, **53** : 488.
263. SHIMIZU, S.; HIRANO, T.; YOSHIOKA, K.; SUGAI, S.; MATSUDA, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; KONDA, S. : Interleukin-6 (B cell stimulatory factor 2)-dependent growth of a Lennert's lymphoma-derived T cell line (KT-3). *Blood*, 1988, **72** : 1826.
264. SHIMIZU, H.; KATSUYUKI, M.; WATANABE, T.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, K.I. : Involvement of a NF- $\kappa$ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell Biol.*, 1990, **10** : 561.
265. SHIRATSUCHI, H.; JOHNSON, J.L.; ELLNER, J.J. : Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 3165.
266. SIEGALL, C.B.; NORDAN, R.P.; FITZGERALD, D.J.; PASTAN, I. : Cell-specific toxicity of a chimeric protein composed of interleukin-6 and *Pseudomonas* exotoxin (IL6-PE40) on tumor cells. *Mol. Cell Biol.*, 1990, **10** : 2443.
267. SIEGALL, C.B.; CHAUDHARY, V.K.; FITZGERALD, D.J.; PASTAN, I. : Cytotoxicity activity of an interleukin-6 *Pseudomonas* exotoxin fusion protein on human myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 9738.
268. SIRONI, M.; BREVIARIO, F.; PROSERPIO, P.; BIONDI, A.; VECCHI, A.; VAN DAMME, J.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A. : IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 549.
269. SMITH, K.A. : Interleukin-2 : inception, impact and implications. *Science*, 1988, **240** : 1169.
270. SNOUWAERT, J.N.; KARIYA, K.; FOWLKES, D.M. : Effects of site-specific mutations on biologic activities of recombinant human IL-6. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 585.
271. SOLARY, E.; GUIGUET, M.; ZELLER, V.; CASASNOVAS, O.R.; CAILLOT, D.; CHAVANET, P.; GUY, H.; MACK, G. : Radioimmunoassay for the measurement of serum IL-6 and its correlation with tumor cell mass parameters in multiple myeloma. *Am. J. Hematol.*, 1992, **39** : 163.
272. SOUTHERN, C.; SCHULSTER, D.; GREEN, I.C. : Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6. *Biochem. J.*, 1990, **272** : 243.
273. SPANGELO, B.L.; ISAKSON, P.C.; MACLEOD, R.M. : Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology*, 1990, **127** : 403.
274. SPANGELO, B.L.; JUDD, A.M.; ISAKSON, P.C.; MACLEOD, R.M. : Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release *in vitro*. *Endocrinology*, 1989, **125** : 575.
275. SPANGELO, B.L.; JUDD, A.M.; ISAKSON, P.C.; MACLEOD, R.M. : Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology*, 1991, **128** : 2685.

276. SPANGELO, B.L.; JUDD, A.M.; MACLEOD, R.M.; GOODMAN, D.W.; ISAKSON, P.C. : Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalami. *Endocrinology*, 1990, **127**: 1779.
277. SPANGELO, B.L.; MACLEOD, R.M.; ISAKSON, P.C. : Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology*, 1990, **126** : 582.
278. SPLAWSKI, J.B.; McANALLY, L.M.; LIPSKY, P.E. : IL-2 dependence of the promotion of human B cell differentiation by IL-6 (BSF-2). *J. Immunol.*, 1990, **144** : 562.
279. STADNYK, A.W.; GAULDIE, J. : The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunol. Today*, 1991, **12** : A7.
280. STARNES, F.H. Jr.; PEARCE, M.K.; TEWARI, A.; YIM, J.H.; ZOU, J.C.; ABRAMS, J.S. : Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *Escherichia coli* infection and lethal tumor necrosis factor  $\alpha$  challenge in mice. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 4185.
281. STITES, D.P.; TERR, A.I. : Basic human immunology. Ed. Appleton & Lange. USA. 1991. p 78.
282. STRYER, L. : Bioquímica. Editorial Reverté. 3a Edición. Barcelona. 1988. p. 573 y 992.
283. SUEMATSU, S.; MATSUDA, T.; AOZASA, K.; AKIRA, S.; NAKANO, N.; OHNO, S.; MIYAZAKI, J.I.; YAMAMURA, K.I.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : IgG1 plasmacytosis in interleukin-6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86** : 7546.
284. SUGASAWARA, R.J.; CAHOON, B.E.; KARU, A.E. : The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis, and growth rate of hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 1985, **79** : 263.
285. SWAAK, A.J.; VAN ROOYEN, A.; NIEUWENHUIS, E.; AARDEN, L.A. : Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic disease. *Scand. J. Rheumatol.*, 1988, **17** : 469.
286. SYNERS, L.; FONTAINE, V.; CONTENT, J. : Modulation of interleukin-6 receptors in human cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1989, **557** : 388.
287. SZPIRER, J.; SZPIRER, C.; RIVIÉRE, M.; HOUART, C.; BAUMANN, M.; FEY, G.H.; POLI, V.; CORTESE, R.; ISLAM, M.Q.; LEVAN, G. : The IL-6-dependent DNA-binding protein gene (transcription factor 5 : TRF5) maps to human chromosome 20 and rat chromosome 3, the IL-6 receptor locus (IL-6R) to human chromosome 1 and rat chromosome 2 and the rat IL-6 gene to rat chromosome 4. *Genomics*, 1991, **101**, (3) : 539.
288. TABIBZADEH, S.S.; POUBOURIDIS, D.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : Interleukin-6 immunoreactivity in human tumors. *Am. J. Pathol.*, 1989, **135** : 427.
289. TABIBZADEH, S.S.; SANTHANAM, U.; SEHGAL, P.B.; MAY, L.T. : Cytokine-induced production of IFN- $\beta$ 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 $\beta$ . *J. Immunol.*, 1989, **142** : 3134.
290. TAGA, T.; HIBI, M.; HIRATA, Y.; YAMASAKI, K.; YASUKAWA, K.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 1989, **58** : 573.

291. TAGA, T.; KAWANISHI, Y.; HARDY, R.R.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Receptors for B cell stimulatory factor-2 (BSF-2) : quantitation, specificity, distribution and regulation of the expression. *J. Exp. Med.*, 1987, **166** : 967.
292. TAKAI, Y.; HERRMAN, S.H.; GREENSTEIN, J.L.; SPITALNY, G.L.; BURAKOFF, S.J. : Requirement for three distinct lymphokines for the induction of cytotoxic T lymphocytes from thymocytes. *J. Immunol.*, 1986, **137** : 3494.
293. TAKAI, Y.; WONG, G.G.; CLARK, S.C.; BURAKOFF, S.J.; HERRMANN, S.H. : B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1988, **140** : 508.
294. TAKATSUKI, F.; OKANO, A.; SUZUKI, C.; CHIEDA, R.; TAKAHARA, Y.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; HAMURO, J.; AKIYAMA, Y. : Human recombinant interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 (IL-6/BSF-2) augments murine antigen-specific antibody response *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 3072.
295. TAMM, I.; CARDINALE, I.; KRUEGER, J.; MURPHY, J.S.; MAY, L.T.; SEGHAL, P.B. : Interleukin-6 decreases cell-cell association and increases motility of ductal breast carcinoma cells. *J. Exp. Med.*, 1989, **170** : 1649.
296. TANABE, O.; AKIRA, S.; KAMIYA, T.; WONG, G.G.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Genomic structure of the murine IL-6 gene : high degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 3875.
297. TANAKA, Y.; SAITO, K.; SHIRAKAWA, F.; OTA, T.; SUZUKI, H.; ETO, S.; YAMASHITA, U. : Production of B cell stimulating factors by B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 3043.
298. TANNER, J.; TOSATO, G. : Impairment of natural killer functions by interleukin 6 increases lymphoblastoid cell tumorigenicity in athymic mice. *J. Clin. Invest.*, 1991, **88** : 239.
299. TANNER, J.; TOSATO, G. : Regulation of B cell growth and immunoglobulin gene transcription by interleukin 6. *Blood*, 1992, **79** (2) : 452.
300. TERANISHI, T.; HIRANO, T.; NAOMICHI, A.; ONOUE, K. : Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor-(TRF) like factor(s). *J. Immunol.*, 1982, **128** : 193.
301. TE VELDE, A.A.; HUIJBENS, R.J.F.; HEIJE, K.; DE VRIES, J.E.; FIGDOR, C.F. : Interleukin 4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IL-6 by human monocytes. *Blood*, 1990, **76** : 1392.
302. THORNTON, A.J.; STRIETER, R.M.; LINDLEY, I.; BAGGIOLINI, M.; KUNKEL, S.L. : Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J. Immunol.*, 1990, **144** : 2609.
303. TITUS, R.G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. : The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunol. Today*, 1991, **12** : A13.
304. TOSATO, G.; TANNER, G.; JONES, K.D.; REVEL, M.; PIKE, S.E. : Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.*, 1990, **64** : 3033.

305. TOSATO, G.; GERRARD, T.L.; GOLDMANN, G.; PIKE, S.E. : Stimulation of EBV-activated human B cells by monocytes and monocyte products : role of IFN- $\beta$ /B cell stimulatory factor 2/IL-6. *J. Immunol.*, 1988, **140** : 4329.
306. TOSATO, G.; PIKE, S.E. : Interferon- $\beta$ /interleukin-6 is a co-stimulant for human T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 1556.
307. TOSATO, G.; SEAMON, K.B.; GOLDMAN, N.D.; SEHGAL, P.B.; MAY, L.T.; WASHINGTON, G.C.; JONES, K.D.; PIKE, S.E. : Identification of a monocyte-derived human cell growth factor as interferon- $\beta$  (BSF-2, IL-6). *Science*, 1988, **239** : 502.
308. TOVEY, M.G.; CONTENT, J.; GRESSER, I.; GUGENHEIM, J.; BLANCHARD, B.; GUYMARHO, J.; POUPART, P.; GIGOU, M.; SHAW, A.; FIER, W. : Genes for INF- $\beta$  (IL-6), tumor necrosis factor, and IL-1 are expressed at high levels in the organs of normal individuals. *J. Immunol.*, 1988, **141** : 3106.
309. TURNER, M. : TGF- $\beta$  induces the production of IL-6 by PBMC. *Cytokine*, 1990, **2** : 211.
310. ULICH, T.R.; YIN, S.; GUO, K.; YI, E.S.; REMICK, D.; DEL CASTILLO, J. : Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. IL-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, 1991, **138** : 1097.
311. UTSUMI, K.; TAKAI, Y.; TADA, T.; OHZEKI, S.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. : Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. *J. Immunol.*, 1990, **145** : 397.
312. UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. : Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. *J. Immunol.*, 1991, **147** : 1803.
313. UYTENHOVE, C.; COULIE, P.G.; VAN SNICK, J. : T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmocytoma growth factor. *J. Exp. Med.*, 1988, **167** : 1417.
314. UYTENHOVE, C.; SIMPSON, R.J.; VAN SNICK, J. : Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 6934.
315. VAIRO, G.; HAMILTON, J.A. : Signalling through CSF receptors. *Immunol. Today*, 1991, **12** : 362.
316. VAN DAMME, J.; CAYPHAS, S.; OPDENAKKER, G.; BILLIAU, A.; VAN SNICK, J. : Interleukin-1 and poly-(rI):(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblast. *Eur. J. Immunol.*, 1987, **17** : 1.
317. VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G.; SIMPSON, R.J.; RUBIRA, M.R.; CAYPHAS, S.; VINK, A.; BILLIAU, A.; SNICK, J.V. : Identification of the human 26-kD protein, interferon  $\beta$  2 (IFN $\beta$ 2), as a B cell hybridoma/plasmocytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 1987, **165** : 914.
318. VAN DAMME, J.; CAYPHAS, S.; VAN SNICK, J.; CONINGS, R.; PUT, W.; LENAERTS, J.P.; SIMPSON, R.J.; BILLIAU, A. : Purification and characterization of human fibroblast-derived hybridoma growth factor identical to T-cell derived B-cell stimulatory factor 2 (interleukin-6). *Eur. J. Biochem.*, 1987, **168** : 543.

319. VAN DAMME, J.; DE LEY, M.; VAN SNICK, J.; DINARELLO, C.A.; BILLIAU, A. : The role of interferon- $\beta$ 2 and the 26kDa protein (interferon- $\beta$ 2) as mediators of the antiviral effect of IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, 1987, **139** : 1867.
320. VAN DAMME, J.; SCHAAFSMA, M.R.; FIBBE, W.E.; FALKENBURG, J.H.F.; OPDENAKKER, G.; BILLIAU, A. : Simultaneous production of interleukin 6, interferon- $\beta$  and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur. J. Immunol.*, 1989, **19** : 163.
321. VAN DAMME, J.; VAN BEEUMEN, J.; DECOCK, B.; VAN SNICK, J.; DE LEY, M.; BILLIAU, A. : Separation and comparison of two monokines with LAF activity (interleukin-1-beta and hybridoma growth factor) : identification of leukocyte-derived HGF as interleukin-6. *J. Immunol.*, 1988, **140** : 1534.
322. VANDENABEELE, P.; FIERS, W. : Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1/IL-6 mediated "acute phase response" in the brain? *Immunol. Today*, 1991, **12** : 217.
323. VAN DER MEER, J.W.M.; HELLE, M.; AARDEN, L.A. : Comparison of the effects of recombinant interleukin 6 and recombinant interleukin 1 on nonspecific resistance to infection. *Eur. J. Immunol.*, 1989, **19** : 413.
324. VAN OERS, M.A.J.; VAN DER HEYDEN, A.A.P.A.M.; AARDEN, L.A. : Interleukin-6 in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, **71** : 314.
325. VANKELECOM, H.; CARMELIET, P.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, J.; DENNOF, C. : Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology*, 1989, **49** : 102.
326. VAN SNICK, J.; CAYPHAS, S.; VINK, A.; UYTENHOVE, C.; COULIE, P.G.; SIMPSON, R.J. : Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a new T 2 cell-derived lymphokine with growth factor activity for B cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83** : 9679.
327. VAN SNICK, J.; UYTENHOVE, C. : Role and mode of action of IL-6 in T cell activation. *Lymphokine Res.*, 1988, **7** : 324.
328. VAN SNICK, J.; VINK, A.; CAYPHAS, S.; UYTENHOVE, C. : Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas. *J. Exp. Med.*, 1987, **165** : 641.
329. VAN SNICK, J.; CAYPHAS, S.; SZIKORA, J.P.; RENAULD, J.C.; VAN ROOST, E.; BOON, T.; SIMPSON, R.J. : cDNA cloning of murine interleukin-HP1 : homology with human interleukin 6. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 193.
330. VAN SNICK, J. : Interleukin 6 : an overview. *Ann. Rev. Immunol.*, 1990, **8** : 253.
331. VILLIGER, P.M.; CRONIN, M.T.; AMENOMORI, T.; WACHSMAN, W.; LOTZ, M. : IL-6 production by human T lymphocytes. Expression in HTLV-1 infected but not in normal T cells. *J. Immunol.*, 1991, **146** : 550.
332. VINK, A.; COULIE, P.; WARNIER, G.; RENAULD, M.; STEVENS, M.; DONCKERS, D.; VAN SNICK, J. : Mouse plasmacytoma growth in vivo : enhancement by interleukin 6 (IL-6) and inhibition by antibodies directed against IL-6 or its receptor. *J. Exp. Med.*, 1990, **172** : 997.



333. VINK, A.; COULIE, P.G.; WAUTERS, P.; NORDAN, R.P.; VAN SNICK, J. : B cell growth and differentiation activity of interleukin-HP1 and related murine plasmacytoma growth factors : synergy with interleukin-1. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18** : 607.
334. WALTHER, Z.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B. : Transcriptional regulation of the interferon- $\beta$ /B cell differentiation factor BSF-2/hepatocyte-stimulating factor gene in human fibroblasts by other cytokines. *J. Immunol.*, 1988, **140** : 974.
335. WARREN, M.K.; CONROY, L.B.; ROSE, J.S. : The role of interleukin-6 and interleukin-1 in megakaryocyte development. *Experimental Hematology*, 1989, **17** : 1095.
336. WATSON, J.M.; SENSINTAFFAR, J.L.; BEREK, J.S.; MARTINEZ MAZA, O : Constitutive production of interleukin 6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. *Cancer Res.*, 1990, **50** : 6959.
337. WHO-IUIS NOMENCLATURE SUBCOMMITTEE ON INTERLEUKIN DESIGNATION : Nomenclature for secreted regulatory proteins of the immune system (interleukins). *Blood*, 1992, **79** : 1645.
338. WEISSENBAACH, H.; CHERNAJOVSKY Y.; ZEEVI, M.; SHULMAN, L.; SOREQ, H.; NIR, U.; WALLACH, D.; PERRICAUDET, M.; TIOLLAIS, P.; REVEL, M. : Two interferon mRNA in human fibroblasts : *In vitro* translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, **77** : 7152.
339. WILLHEIM, M.; GESSL, A.; BERGER, R.; SCHEDULE, A.; LUGER, T.; FÖSTER, O.; BOLTZ-NITULESCU, G. : IL-6 augments Fc IgE receptor (Fc $\epsilon$  RII/CD23) expression on human monoblastic/monocytic cell lines U937, THP-1, and Mono-Mac-6 but not on blood monocytes. *J. Immunol.*, 1991, **147** : 1837.
340. WILLIAMS, N.; DE GIORGIO, T.; BANU, N.; WITHY, R.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Recombinant interleukin 6 stimulates immature murine megakaryocytes. *Experimental Hematology*, 1990, **18** : 69.
341. WONG, G.C.; CLARK, S.C. : Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol. Today*, 1988, **9** : 137.
342. WONG, G.G.; WITEK-GIANNOTTI, G.S.; TEMPLE, P.A.; KRIZ, R.; FERENZ, C.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; IKEBUCHI, K.; OGAWA, M. : Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6. *J. Immunol.*, 1988, **140** : 3040.
343. YAMASAKI, K.; TAGA, T.; HIRATA, Y.; YAWATA, H.; YAWANISHI, Y.; SEED, B.; TANIGUCHI, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/INF-beta-2) receptor. *Science*, 1988, **241** : 825.
344. YANG, Y.C.; RICCIARDI, S.; CIARLETTA, A.; CALVETTI, J.; KELLEHER, K.; CLARK, S.C. : Expression cloning of a cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor : human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood*, 1989, **74** : 1880.
345. YAP, S.H.; MOSHAGE, H.J.; HAZENBERG, B.P.C.; ROELOFS, H.M.J.; BIJZET, J.; LIMBURG, P.C.; AARDEN, L.A.; VAN RIJSWIJK, M.H. : Tumor necrosis factor (TNF) inhibits interleukin (IL)-1 and/or IL-6 stimulated synthesis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in primary cultures of human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1991, **1091** : 405.

346. YASUKAWA, K.; HIRANO, T.; WATANABE, Y.; MURATANI, K.; MATSUDA, T.; NAKAI, S.; KISHIMOTO, T. : Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF 2/IL-6) gene. *EMBO J.*, 1987, **6** : 2939.
347. YONISH-ROUACH, E.; RESNITSKY, D.; LOTEM, J.; SACHS, L.; KIMCHI, A.; OREN, M. : Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 1991, **352** : 345.
348. YOSHIZAKI, K.; MATSUDA, T.; NISHIMOTO, N.; KURITANI, T.; TAEHO, L.; AOZASA, K.; NAKAHATA, T.; KAWAI, H.; TAGOH, H.; KOMORI, T.; KISHIMOTO, S.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. : Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*, 1989, **74** : 1360.
349. ZHANG, Y.; LIN, J.X.; VILCEK, J. : Synthesis of interleukin 6 (interferon- $\beta$ /B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** : 6177.
350. ZHANG, Y.; LIN, J.X.; YIP, Y.K.; VILCEK, J. : Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblast : role in the induction of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85** : 6802.
351. ZHANG, X.G.; KLEIN, B.; BATAILLE, R. : Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood*, 1989, **74** : 11.
352. ZILBERSTEIN, A.; RUGGIERI, R.; KORN, J.H.; REVEL, M. : Structure and expression of cDNA and genes for human interferon- $\beta$ , a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.*, 1986, **5** : 2529.

## 14. Apéndice.

### 14. 1. Lista de abreviaturas.

| Nombre  | Abreviatura    |
|---|----------------|
| Adenina .....   | A              |
| Aminoácidos .....   | aa             |
| $\alpha$ 1-antitripsina .....                             | $\alpha$ 1-AT  |
| $\alpha$ 1-antiquimotripsina .....                        | $\alpha$ 1-ACH |
| $\alpha$ 1-glicoproteína ácida .....                      | $\alpha$ 1-AGP |
| $\alpha$ 1-inhibidor de proteasas .....                   | $\alpha$ 1-IP  |
| $\alpha$ 2-macroglobulina .....                           | $\alpha$ 2-M   |
| Adenosin monofosfato cíclico .....                        | AMPc           |
| Proteína activadora-1 .....                               | AP-1           |
| Proteínas de fase aguda .....                             | APP            |
| Factor activante de linfocitos B .....                    | BAF            |
| Factor de diferenciación de las células B .....           | BCDF           |
| Factor de crecimiento de las células B .....              | BCGF           |
| Hipotálamo basal-medio .....                              | BMH            |
| Factor estimulante de las células B .....                 | BSF            |
| Citosina .....  | C              |
| Tercer componente del sistema complemento .....           | C3             |
| Marcador antigénico de linfocitos T .....                 | CD3            |
| Marcador antigénico de linfocitos TH .....                | CD4            |
| Receptor para la Fc de la IgE ( Fc $\epsilon$ RII ) ..... | CD23           |
| Marcador antigénico de linfocitos Tc .....                | CD8            |
| Ceruloplasmina .....                                      | CER            |
| Unidades formadoras de colonias .....                     | CFU            |
| Factor de transcripción para CCAAT .....                  | C/EBP          |
| Inhibidor de la cisteína proteasa .....                   | CPI            |
| Oncogenes .....   | c-fos          |
|   | c-myc          |
| Concanavalina A .....                                     | Con A          |
| Elemento con secuencias consenso para el AMPc .....       | CRE            |
| Hormona liberadora de corticotropina .....                | CRH            |
| Proteína C reactiva .....                                 | CRP            |
| Factor estimulante de colonias .....                      | CSF            |
| Diacilglicerol .....                                      | DAG            |

|  |          |
|--|----------|
| Acido desoxirribonucleico .....                          | DNA      |
| DNA complementario .....                                 | DNAc     |
| RNA de doble cadena .....                                | dsRNA    |
| Virus de Epstein-Barr .....                              | EBV      |
| Moléculas de adhesión endotelio-leucocito .....          | ELAM     |
| Eritropoyetina .....                                     | EPO      |
| Fragmento cristalizabte de las inmunoglobulinas .....    | Fc       |
| Fibrinógeno .....  | FBG      |
| Hormona folículoestimulante .....                        | FHS      |
| Células folículo estrelladas .....                       | FS       |
| Guanina .....  | G        |
| Factor estimulante de colonias de granulocitos .....     | G-CSF    |
| Hormona del crecimiento .....                            | GH       |
| CSF de granulocitos y macrófagos .....                   | GM-CSF   |
| Hormona liberadora de gonadotropinas .....               | GnRH     |
| Glucoproteína .....                                      | gp       |
| Elemento sensible a glucocorticoides en el gene IL-6 ... | GRE      |
| Guanosin trifosfato .....                                | GTP      |
| Humano .....   | h        |
| IL-6 humana .....  | hIL-6    |
| Virus de la inmunodeficiencia humana .....               | HIV      |
| Antígeno de leucocitos humanos .....                     | HLA      |
| Factor del crecimiento de hibridomas/plasmocitomas ...   | HPGF     |
| Haptoglobina .....                                       | HPT      |
| Hemopexina .....   | HPX      |
| Virus de la leucemia de linfocitos T humanos .....       | HTLV     |
| Inmunoglobulinas .....                                   | Ig       |
| Interleucinas .....                                      | IL       |
| Receptor de las interleucinas .....                      | IL-R     |
| Interferones .....                                       | IFN      |
| <br>   |          |
| Kilobase .....   | kb       |
| <br>   |          |
| Constante de disociación .....                           | Kd       |
| Kilodaltons .....  | kDa      |
| Factor activante de linfocitos .....                     | LAF      |
| Células asesinas activadas por linfocinas .....          | LAK      |
| Linfocitos granulares gigantes .....                     | LGL      |
| Hormona luteinizante .....                               | LH       |
| Factor inhibidor de leucocitos .....                     | LIF      |
| Lipopolisacárido .....                                   | LPS      |
| Linfotoxina .....  | LT       |
| Molar .....  | M        |
| Anticuerpos monoclonales .....                           | mAc      |
| Macrófago .....  | M $\phi$ |
| Muramil dipéptido .....                                  | MDP      |
| Complejo principal de histocompatibilidad .....          | MHC      |
| Inmunoglobulina de membrana .....                        | mIg      |
| Células fagocíticas mononucleares .....                  | MPCs     |
| Elemento sensible múltiple del gene de IL-6 .....        | MRE      |
| Factor de crecimiento de nervios .....                   | NGF      |
| Amino terminal .....                                     | N-       |
| Células asesinas naturales .....                         | NK       |
| Carboxilo terminal .....                                 | O-       |

|  |          |
|--|----------|
| Anticuerpos policlonales .....                     | pAc      |
| Factor activador de plaquetas .....                | PAF      |
| Pares de bases .....                               | pb       |
| Fosfoinosítido .....                               | PI       |
| Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato .....            | PIP2     |
| Proteína cinasa A .....                            | PKA      |
| Proteína cinasa C .....                            | PKC      |
| Picomoles .....                                    | pM       |
| Peso molecular .....                               | PM       |
| Diéster (miristato acetato) de forbol .....        | PMA      |
| Leucocito polimorfonuclear .....                   | PMN      |
| Factor de crecimiento derivado de plaquetas .....  | PDGF     |
| Factor del crecimiento de plasmocitomas .....      | PCT-GF   |
| Prostaglandinas .....                              | PG       |
| Fitoheماغلوتينina .....                            | PHA      |
| Ácido ribocitídilico polirribonósico .....         | poli I-C |
| Prolactina .....                                   | PRL      |
| Fitolaca americana .....                           | PWM      |
| Interleucina recombinante .....                    | rIL      |
| Ácido ribonucleico .....                           | RNA      |
| RNA mensajero .....                                | RNAm     |
| Staphylococcus aureus Cowan I .....                | SAC      |
| Proteína P amiloide sérica .....                   | SAP      |
| Inmunoglobulinas de secreción .....                | sIg      |
| Sustancia K .....                                  | SK       |
| Sustancia P .....                                  | SP       |
| Elemento sensible a suero en el gene de IL-6 ..... | SRE      |
| Timidina .....                                     | T        |
| Linfocitos T citotóxicos .....                     | Tc       |
| Células epiteliales tímicas .....                  | TE       |
| Linfocitos T colaboradores .....                   | TH       |
| Factor de crecimiento de células T .....           | TCGF     |
| Factor transformador del crecimiento .....         | TGF      |
| Factor necrosante de tumores .....                 | TNF      |
| 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato .....          | TPA      |
| Péptido intestinal vasoactivo .....                | VIP      |
| Células del músculo liso vascular .....            | VSMC     |

## 14. 2. Lista de las Figuras

| FIGURA  | PAGINA |
|---|--------|
| Fig. 1. Estimulación de la hematopoyesis por las citocinas. ....                              | 7      |
| Fig. 2. Inducción de la síntesis de DNA por el CSF-1. ....                                    | 8      |
| Fig. 3. Actividades de las cuatro primeras interleucinas. ....                                | 15     |
| Fig. 4. Secuencia de nucleótidos y de aa en los 4 exones de IL-6. ....                        | 24     |
| Fig. 5. Tamaño y localización de los exones e intrones de IL-6,<br>humana y murina.....       | 26     |
| Fig. 6. Sitios de inicio de la transcripción del gene de IL-6. ....                           | 28     |
| Fig. 7. Esquema de la región flanqueante 5' del gene de IL-6. ....                            | 30     |
| Fig. 8. Secuencias de aa de IL-6, humana y murina. ....                                       | 33     |
| Fig. 9. Secuencia de aminoácidos de IL-6 y G-CSF. ....  | 39     |
| Fig. 10. Similitudes entre la localización y el tamaño de los exones<br>en IL-6 y G-CSF. .... | 40     |
| Fig. 11. Secuencia de nucleótidos y aa del IL-6R. ....  | 45     |
| Fig. 12. Estructura bidimensional del IL-6R. ....   | 48     |
| Fig. 13. Señales intracelulares para sintetizar IL-6. ....                                    | 57     |
| Fig. 14. Fórmula de la dexametasona. ....   | 58     |
| Fig. 15. IL-6 y la producción de anticuerpos ....   | 67     |
| Fig. 16. IL-6 y la activación de células T. ....  | 73     |
| Fig. 17. Proteínas de fase aguda e IL-6. ....   | 85     |
| Fig. 18. La IL-6 en las interacciones de los sistemas neuroendócrino<br>e inmunitario. ....   | 100    |
| Fig. 19. IL-6 e hipofisis. ....   | 103    |
| Fig. 20. La IL-6 y el HIV. ....   | 135    |

### 14. 3. Lista de las Tablas.

| TABLA   | PAGINA |
|---|--------|
| TABLA I. Clasificación de las citocinas más importantes. ....                           | 5      |
| TABLA II. Principales actividades biológicas de las IL. ....                            | 19     |
| TABLA III. Factores iguales a la IL-6. ....   | 22     |
| TABLA IV. Propiedades fisicoquímicas de IL-6 humana y murina. ....                      | 36     |
| TABLA V. Variedades de la IL-6. ....  | 38     |
| TABLA VI. Células productoras de IL-6. ....   | 43     |
| TABLA VII. Receptores homólogos con la gp130. ....                                      | 50     |
| TABLA VIII. Propiedades fisicoquímicas del IL-6R y gp130. ....                          | 51     |
| TABLA IX. Células que expresan el IL-6R. ....   | 52     |
| TABLA X. Principales inductores de IL-6. ....   | 55     |
| TABLA XI. Proteínas de fase aguda inducidas por IL-6, IL-1 y TNF. ....                  | 83     |
| TABLA XII. Citocinas que participan en la respuesta antinfeciosa. ....                  | 87     |
| TABLA XIII. Enfermedades relacionadas con la desregulación<br>del gene de la IL-6. .... | 125    |
| TABLA XIV. Células cancerosas sobre las que actúa IL-6. ....                            | 140    |