



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

LABORATORIO DE DIFERENCIACION
CELULAR Y CANCER

ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIADOR DE
INTERLEUCINA-6 RECOMBINANTE HUMANA (rhIL-6)
SOBRE MACROFAGOS PULMONARES Y
PERITONEALES DE RATAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JORGE HERNANDEZ MONTES





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.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco Teórico.....	5
-Regulación del Sistema Hematopoyético por factores humorales.....	5
-El Sistema mononuclear fagocítico.....	10
-Fagocitosis mediada por anticuerpo.....	14
-Biología de las interleucinas 1 y 6.....	18
Objetivos.....	22
Método.....	23
Resultados.....	28
Discusión.....	42
Bibliografía.....	49

RESUMEN

Los leucocitos de la sangre participan en la respuesta inmune del organismo. Su desarrollo, desde precursores hasta células maduras funcionales, se ve regulado por factores humorales, generalmente glicoproteínas, entre los que se encuentran los Factores Estimuladores de Colonias y las Interleucinas.

En este trabajo evaluamos la capacidad de la interleucina-6 recombinante humana (rhIL-6) para incidir en la diferenciación de macrófagos normales. Nuestros resultados demuestran que IL-6 es capaz de inducir receptores Fc tanto en macrófagos pulmonares como macrófagos peritoneales de ratón. Además, este efecto es dosis-dependiente, y las concentraciones para las cuales fue activa IL-6 quedan dentro del intervalo de concentraciones fisiológicas de IL-6. Por otra parte, la inducción de receptores Fc en macrófagos peritoneales no es inducida sinérgicamente por IL-1 e IL-6. La capacidad de IL-1 para inducir estos receptores se bloquea por antiIL-6, y el efecto inductor de IL-6 por antiIL-1.

Asimismo, la inducción de receptores Fc por IL-6 no se bloquea por anticuerpos dirigidos contra los receptores Fc tipo I ni II, sugiriendo que posiblemente se inducen receptores del tipo III.

Estos resultados contribuyen al conocimiento básico de la regulación de los procesos inmunes, describiendo una actividad no reportada antes para IL-6. Se discute la posibilidad del uso de factores biológicos como una alternativa de uso terapéutico futuro.

INTRODUCCION

Las células derivadas del proceso hematopoyético, localizadas en la sangre y en otros tejidos, cumplen funciones que permiten mantener la homeostasis del organismo y, de manera muy importante, realizan la defensa inmune del organismo (1).

La producción de estas, que se derivan de precursores pluripotenciales localizados en la médula ósea (3), es regulada por factores microambientales, como lo son interacciones célula-célula y la presencia de citocinas, generalmente glicoproteínas, las que regulan la dirección de la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas, desde los precursores pluripotenciales hasta llegar a ser una célula madura de un linaje específico, capaz de cumplir con sus funciones efectoras (3).

Como parte de este sistema hematopoyético se encuentra el sistema mononuclear fagocito, el cual comprende a sus precursores de la médula ósea, a los promonocitos, monocitos en sangre periférica, y a los macrófagos, que se conocen colectivamente como histiocitos y se localizan en diferentes tejidos en casi todo el organismo (22).

Este sistema celular en sus estadios más avanzados presenta la capacidad de fagocitar, ya sea inespecíficamente o específicamente, a través de diversos receptores de membrana, entre ellos, receptores para oligosacáridos, para componentes del complemento, y para la región Fc (Fracción cristalizante) de las inmunoglobulinas del tipo G (40). Asimismo, las células monocito-macrófago son capaces de secretar al medio una gran

variedad de sustancias, como citocinas, componentes del complemento, enzimas, inhibidores, etc. Del mismo modo, son susceptibles a responder a distintas citocinas (24), para ser una célula capaz de regular y responder al ambiente (25).

La función fagocítica del sistema monocito-macrófago se constituye como una de las primeras defensas del organismo y a través de ella es posible la eliminación de microorganismos, células caducas y gérmenes patógenos en general (25). Esta actividad se ve reforzada cuando el blanco a fagocitar está recubierto por anticuerpos, proteínas secretadas por linfocitos B capaces de unirse a los elementos extraños de naturaleza antigénica. Estos anticuerpos enlazan por una región variable al antígeno y por la otra región (región Fc) se unen a las células portadoras de receptores para esa fracción, entre ellas, los monocitos y macrófagos (44). El linaje monocito-macrófago se ve regulado en su etapa temprana por los factores hematopoyéticos CSF (del inglés Colony Stimulating Factor): Multi-CSF, GM-CSF (CSF para macrófagos y granulocitos), y M-CSF (CSF para macrófagos. Posteriormente, su función madura se regula por factores tales como interleucina-2, interleucina-4, interferón- γ , factor de necrosis tumoral, e interleucina-1, los cuales activan a estas células y las estimulan para producir otras citocinas (22,24,25). Sin embargo, el conocimiento acerca de la regulación de este tipo celular aun no es completo.

En este sentido, aun no ha sido determinado totalmente el papel que tienen algunas proteínas en la regulación de las actividades de estas células. Es el caso de interleucina-6, una molécula con una amplia gama de funciones y que es capaz de estimular la

hematopoyesis y la formación de colonias de precursores mieloides in vitro. Sin embargo, aun no es claro si este efecto es directo o indirecto.

Por otro lado, IL-6 es una molécula que presenta una alta homología estructural con el Factor estimulador de colonias de granulocitos y con el factor denominado MGI-2 (Inductor de macrófagos y granulocitos tipo 2, del inglés Macrophage and granulocyte Inducer 2), las cuales son moléculas capaces de diferenciar células mieloides (72,13) . Asimismo, IL-6 está funcionalmente muy relacionada con IL-1, al traslapar su espectro biológico y sinergizar en varias funciones (95-98). Resulta interesante considerar que IL-1 ha sido descrita recientemente por nuestro grupo de trabajo como una molécula capaz de inducir la expresión de receptores Fc en macrófagos normales y en líneas celulares monocíticas de ratón.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo reportamos los resultados de un estudio efectuado para determinar la capacidad de IL-6 para incidir en la diferenciación de células macrofágicas. Particularmente, estudiamos la capacidad de IL-6 para inducir la expresión de receptores Fc en macrófagos pulmonares y peritoneales de ratón.

MARCO TEORICO

Regulación del sistema hematopoyético por factores humorales.

Los diferentes elementos celulares y humorales presentes en la sangre cumplen funciones que permiten el mantenimiento de la homeostasis del organismo, y la defensa inmunológica del mismo (1). Debido a la naturaleza de su función, las células sanguíneas se ubican dentro de un sistema sumamente dinámico: la vida media de algunas de estas células es relativamente corta y su población se mantiene mediante una tasa de renovación muy alta (2); por ello, se requiere de un proceso biológico que aporte constantemente de células maduras y funcionales. Este proceso, que se conoce como hematopoyesis, tiene su origen en la médula ósea, lugar donde se localizan células progenitoras "tallo" totipotenciales capaces de autorrenovarse, o diferenciarse para quedar determinadas a dar lugar a un tipo específico de estirpe o población celular, que en su etapa madura pasará a cumplir su función correspondiente (3) Figura 1. El compartimento hematopoyético es un continuo donde podemos encontrar en un momento determinado células en los diferentes estadios de maduración, dando como resultado un sutil equilibrio que permite plasticidad en la proliferación y diferenciación celular para adecuarse a las diferentes circunstancias fisiológicas que pueden presentarse al organismo, por ejemplo, el estado infeccioso.

La evidencia de la existencia de células precursoras multipotenciales en la médula ósea, se derivó de experimentos

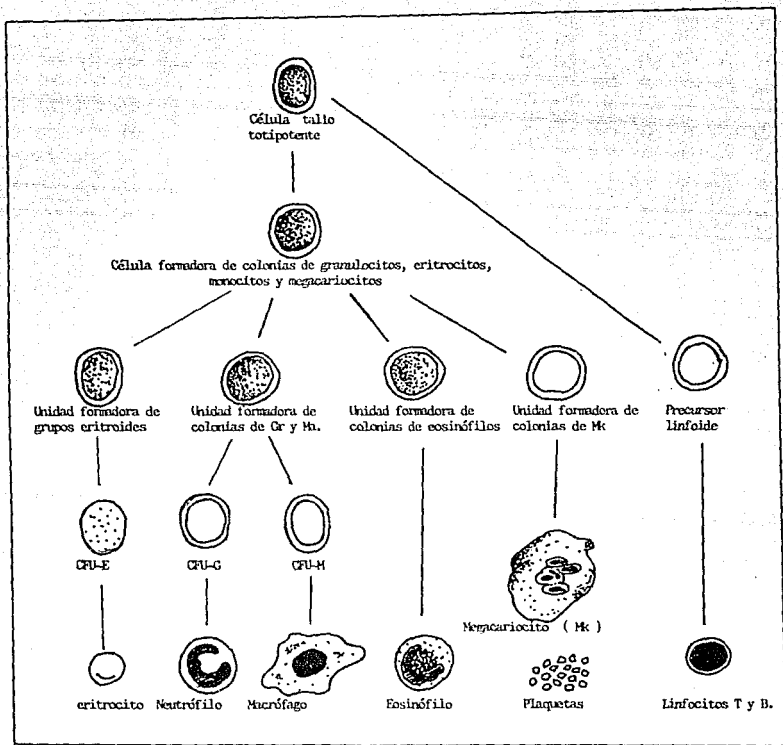


Fig. 1. Hematopoyesis. Las células sanguíneas maduras se derivan de un precursor común en la médula ósea. (Basado en referencia 22)

consistentes en la implantación de células de médula ósea marcadas, en ratones depletados de tal población celular. Es clásico el experimento de Till y McCulloch (4) en que en el bazo de ratones irradiados se forman colonias discretas de los diferentes tipos celulares sanguíneos maduros, a partir de precursores primitivos. Desde entonces, el estudio del sistema hematopoyético ha avanzado considerablemente en los últimos años, sostenida en forma importante por la técnica de cultivo de tejidos y por la disponibilidad de proteínas recombinantes.

El cultivo de tejidos consiste en el mantenimiento de poblaciones celulares fuera del organismo de proveniencia, aportándoseles los requerimientos ambientales esenciales para su supervivencia, como lo son: un sustrato, nutrimentos, temperatura y pH adecuados (5). De esta forma, se establecieron cultivos de colonias de células hematopoyéticas con un soporte de fibroblastos alimentadores, que posteriormente fueron sustituidos por sus medios condicionados, ya que éstos contenían los factores necesarios para soportar el crecimiento de las células hematopoyéticas (6). A partir de estos experimentos, se ha venido determinando la existencia de diferentes estadios para las células sanguíneas, empleando medios de cultivo líquidos y semisólidos cada vez más complejos y capaces de cubrir los requerimientos de tipos celulares más específicos (7).

Por otra parte, la disponibilidad de proteínas recombinantes, obtenidas en laboratorio mediante la inserción de genes en células que finalmente producirán y secretarán esa proteína, ha permitido evaluar la capacidad de esas citocinas en cultivos *in vitro*, y recientemente *in vivo*, para afectar la proliferación o

diferenciación de determinadas poblaciones celulares. De esta manera han sustituido a los medios condicionados en los cuales no existe la seguridad de cual o cuales factores son los responsables de una actividad determinada, y estas proteínas presentan la característica de ser altamente purificada.

Estas dos técnicas en conjunto han permitido observar aisladas del complejo hematopoyético diversas interacciones entre células, así como la respuesta de una variedad de estas a diferentes citocinas para producir una amplia gama de actividades proliferadoras y diferenciadoras, que estudiadas de manera global, han facilitado la formación del concepto del proceso hematopoyético, y la manera como estas células se relacionan con diversos procesos fisiológicos.

Sin embargo, aun no ha sido posible explicar totalmente cómo se regula el mecanismo por el que las células precursoras quedan determinadas para posteriormente diferenciarse y generar un clon de células maduras y funcionales. Aunque existe la proposición de un modelo estocástico para la determinación de estas células (8), el ambiente juega un papel muy importante en tal regulación a través de interacciones célula-célula (9) y por la presencia de factores humorales, generalmente de carácter glicoproteico (10), que regulan la dirección de la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Entre esos factores humorales se cuenta la presencia de factores proteicos, ampliamente caracterizados en la actualidad, y que se conocen genéricamente como Factores Hematopoyéticos Proliferadores (HGF del inglés Hematopoietic Growth Factors) (11).

Los primeros factores conocidos con la capacidad de influir en

las células hematopoyéticas son unas moléculas glicoproteicas con habilidad para inducir la proliferación de células hematopoyéticas en cultivos semisólidos. Estos factores se definieron primeramente por la escuela de Sachs y colaboradores con el nombre genérico de MGI (del inglés Macrophage and Granulocyte Inducer) (12), de los cuales existirían un tipo 1 proliferador, y un tipo 2 (13), producido en respuesta a la acción del tipo 1 y con capacidad diferenciadora.

Estas mismas moléculas fueron posteriormente conocidas más ampliamente como CSF (del inglés Colony Stimulating Factor) según Dexter (14), quien logró su clonación, y propuso que afectaban la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas en diferentes estadios de maduración. De esta manera, en la actualidad se conoce un multi-CSF que actúa a nivel de precursores hematopoyéticos tempranos (15), un GM-CSF que actúa a nivel de precursores de macrófagos y granulocitos (16), y existen CSF para estadios más maduros: G-CSF (17) y M-CSF (14) que tendrán efecto en células más diferenciadas, granulocitos y macrófagos respectivamente.

Posteriormente se han venido determinando otras moléculas con actividad en células hematopoyéticas mieloides, como es el caso de las interleucinas, un grupo de proteínas que inicialmente se reportó que eran producidas por células linfoides y monocitos, y que tenían la capacidad para afectar la proliferación y/o diferenciación de células linfoides y mieloides, aunque hoy el término interleucina se utiliza para referir una variedad de proteínas producida por una amplia variedad de tipos celulares y que afecta también a células no hematopoyéticas (18,19).

El sistema mononuclear-fagocítico.

En la sangre se distinguen ocho tipos celulares maduros: eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T, linfocitos B y macrófagos.

Entre ellos, el linaje monocito-macrófago tiene su origen en la médula ósea, donde a partir de la célula tallo pluripotencial se origina una unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos (CFU-GM del inglés Colony Forming Unit of Granulocytes and Macrophages) (20). Posteriormente, de esta unidad se originan, por un lado, los precursores neutrófilos mieloblastos, y por otro lado, el monoblasto y el promonocito, el cual ya presenta las características propias de un monocito maduro, el siguiente estadio de maduración (21) Figura 2.

De la médula ósea el monocito pasa a sangre periférica y eventualmente entra al tejido, donde se desarrollará para originar un macrófago (22). Aquí, el macrófago puede establecerse por meses e inclusive lograr una modesta tasa de renovación proliferando en áreas de inflamación. El hecho de que un macrófago se establezca en un tejido específicamente, determina las características citoquímicas particulares que éstos adquieran. Por tanto, los macrófagos reciben nombres más específicos basados en su localización en el cuerpo (22) Figura 2.

Los macrófagos presentan diversas funciones más o menos comunes, que los caracterizan. Una de estas funciones es la fagocitosis de microorganismos, restos celulares, células senescentes y otras partículas, factores coagulados de la sangre, complejos antígeno-anticuerpo y sustancias tóxicas en general (23).

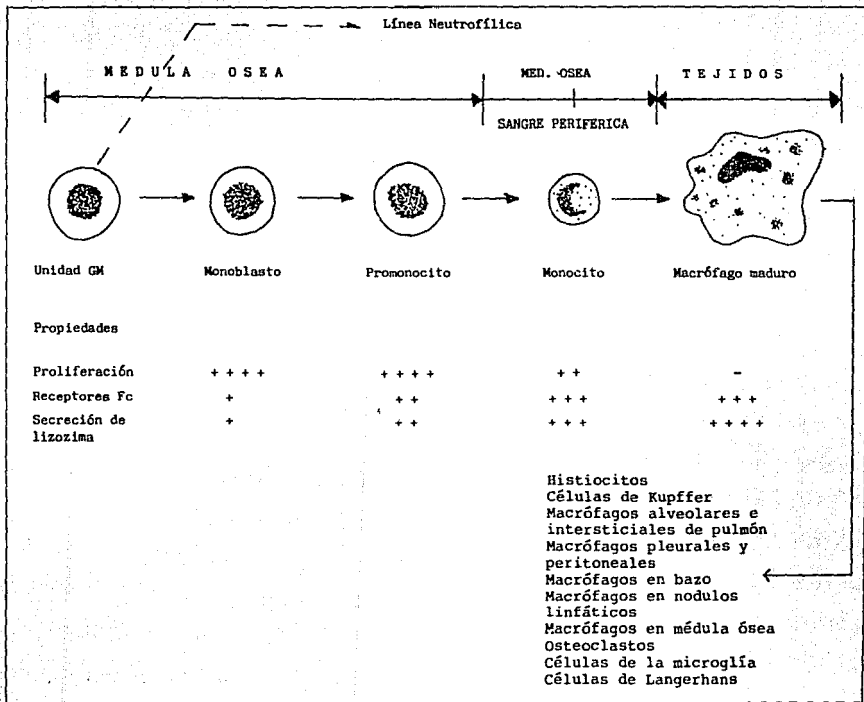


Fig.2. Desarrollo del sistema mononuclear fagocítico. (Basado en referencia 22).

Además de fagocitar, los macrófagos son células capaces de liberar al medio diversas sustancias, entre ellas, factores peptídicos para diferentes actividades: IL-1 α y β , IL-6, interferones, TNF, PDGF, FGF, TGF β , Epo, CSF, etc. También secretan diversas enzimas, como la lisozima y peroxidasa, inhibidores de enzimas y citocinas, componentes del complemento y una amplia variedad de productos metabólicos. (24) El macrófago es una célula que responde y condiciona el ambiente (25).

Respecto a los macrófagos establecidos en el pulmón, éstos presentan al menos tres tipos distinguibles: macrófagos alveolares, los más prominentes ubicados en la superficie alveolar; macrófagos de las vías aéreas, posiblemente resultantes de la migración de alveolares; y macrófagos intersticiales, que a diferencia de los anteriores, se localizan dentro de diversos compartimentos del tejido conectivo (26).

La proveniencia de los macrófagos pulmonares aun es punto de controversia. Su origen, finalmente, se deriva de la médula ósea; sin embargo, se pensó que el sostenimiento de la población era posible gracias a la continua entrada de monocitos circulantes en la sangre periférica. Ahora existen evidencias de que presentan una tasa de renovación pequeña, pero capaz de sostener el número poblacional. (27) Posiblemente ambos mecanismos se efectúen, dependiendo de las condiciones fisiológicas, aunque no es claro cual mecanismo predomina bajo determinadas condiciones.

El papel más importante de los macrófagos pulmonares es mantener limpia y estéril la superficie pulmonar, principalmente a través de la ingestión de partículas y patógenos inhalados, y células caducas, o bien, a través de la secreción de enzimas

líticas, especialmente lisozima (28,29). Además, los macrófagos pulmonares secretan una variedad de proteínas y colaboran con linfocitos en la presentación de antígeno (30).

Por otra parte, los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal constituyen aproximadamente un 55% de la población de esa cavidad y son muy convenientes en el estudio celular por su fácil obtención (31). Estos macrófagos presentan características diferentes a los macrófagos de la cavidad peritoneal inducidos por algún agente irritante.

Actualmente se considera que la población de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, al igual que los macrófagos pulmonares, se mantiene mediante autorrenovación y los monocitos presentes en la cavidad peritoneal no corresponde a precursores, sino que son células transitorias de esa cavidad y no se relacionan con los macrófagos residentes (32).

Ambas poblaciones macrofágicas son heterogéneas dentro de sí mismas y son marcadamente diferentes entre ellas, debido al microambiente en el cual se desarrollan y por los diferentes estados de activación (33).

Esta diferencia se refleja en el hecho de que el metabolismo de los macrófagos pulmonares es a base de fosforilación, mientras que el metabolismo de los macrófagos peritoneales es a base de glicólisis (34). Asimismo, mientras el contenido lisosomal y de enzimas hidrolíticas de los macrófagos alveolares es mayor que el de los macrófagos peritoneales (35,36), éstos últimos expresan receptores Fc a una mayor densidad que los primeros (37).

Fagocitosis mediada por anticuerpo.

La respuesta inmune de los organismos superiores se constituye a base de complejos sistemas, donde mecanismos celulares y humorales interactúan estrechamente (38). Una de las formas de esa respuesta es la fagocitosis, la cual se da a través del sistema mononuclear fagocítico y polimorfonucleares, principalmente. El sistema mononuclear fagocítico, que comprende los monocitos circulantes y los macrófagos establecidos en los tejidos, (39) presenta en su membrana aproximadamente unos cuarenta tipos de receptores, de los cuales por lo menos tres participan en la fagocitosis: para oligosacáridos, para componentes del complemento y para la región Fc (del inglés Fraction Cristalizable) de inmunoglobulinas (40) Figura 3.

Las inmunoglobulinas son proteínas secretadas por linfocitos B y tienen propiedades de anticuerpo, es decir, tienen la capacidad de unirse al elemento extraño (antígeno) que provocó su secreción. Aunque son un grupo heterogéneo presentan características generales correspondientes. La estructura básica de las inmunoglobulinas consta de dos cadenas peptídicas pesadas (H, del inglés heavy) unidas entre sí por puentes disulfuro, a cada una de las cuales se les une una cadena ligera (L, del inglés light) en la región próxima al extremo aminoterminal por la parte externa, también a través de enlaces disulfuro (41). De esta manera, la estructura se puede representar con forma de "Y" en que el extremo amino-terminal de esta estructura es una región variable y el extremo carboxilo es una región más o menos constante (42). La región variable, denominada región Fab (del

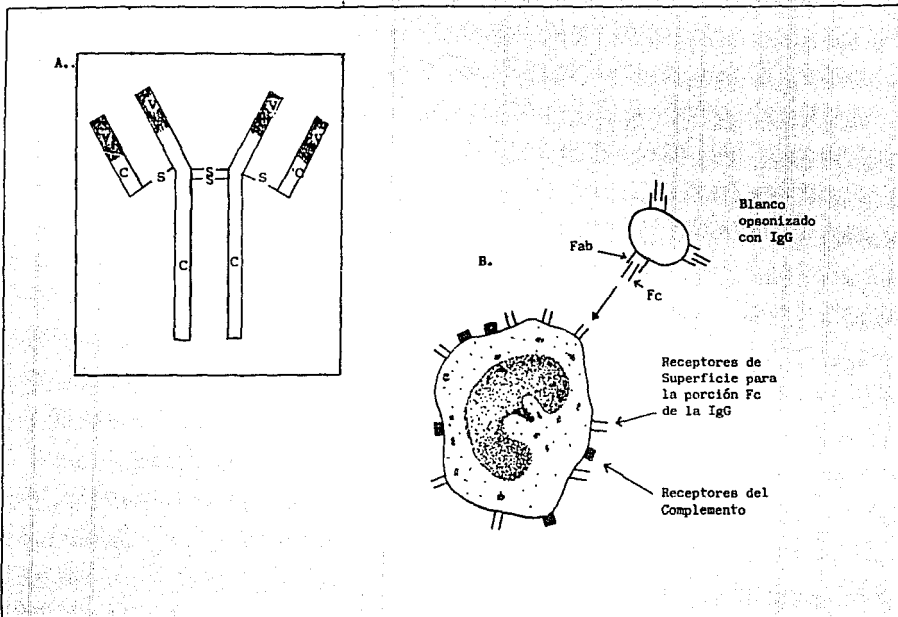


Fig. 3. A. Estructura básica de las inmunoglobulinas. B. Los receptores Fc del macrófago se unen a blancos rodeados por anticuerpo para favorecer la fagocitosis.

(Basado en referencia 38).

inglés Fraction antigen binding) se une a los diferentes antígenos, en tanto que la región más o menos constantes, denominada Fc (Fraction cristalizabile), se une a las diferentes células efectoras que portan receptores para ella, y promueve la actividad biológica. Figura 3A.

Al tratar esta molécula con papaína se da lugar a tres fragmentos (43), dos segmentos Fab, y el tercer segmento comprende la región constante, carboxilo terminal, Fc, que se une a las células efectoras . macrófagos para iniciar el proceso de fagocitosis entre otras actividades.

Los receptores para Fc son expresados en diferentes tipos celulares como lo son: granulocitos, células NK, monocitos-macrófagos, y actúan en conjunto con anticuerpos específicos para realizar el enlace e ingestión de una variedad de antígenos y microbios, aunque se ha descrito que son capaces de realizar también la remoción de eritrocitos caducos (44,45). La expresión de los receptores Fc es dependiente del estado de activación celular (46).

Actualmente se clasifica a los receptores Fc para la IgG (Fc γ R) en tres grupos considerando como criterios el tamaño molecular, afinidad por el ligando, especificidad por el ligando, distribución en tipos celulares y, de manera muy importante, diferencias antigénicas reveladas por anticuerpos monoclonales (47).

Así, el grupo I se constituye por Fc γ RI humano y por Fc γ RI de ratón, y se caracteriza por presentar una alta afinidad por ligandos monoméricos. Es presentado sobre monocitos y macrófagos y en neutrófilos humanos inducido por interferón (48). El tamaño

de hFcγRI es aproximadamente de 72 kDa (49) y el de ratón 67 kDa (50). Su cuantificación se ha establecido de unas decenas de miles (51), mientras que rFcγRI son mucho más abundantes (52).

El grupo 2 se forma por los tipos humanos FcγRIIa, FcγRIIa', FcγRIIb y el tipo FcγRIIβ de ratón y está presente en todos los tipos celulares portadores de FcR, excepto NK (47), y su afinidad por ligandos monoméricos es baja. El peso molecular de los receptores FcRII humanos se ha estimado en 40kDa (53) y FcγRIIβ de ratón entre 40-60 kDa (54). La densidad (expresada como número de receptores/célula) se ha determinado desde 10^3 en plaquetas (55) a más de 10^5 en macrófagos de ratón (52).

El grupo 3 abarca al receptor humano FcγRIII y, bajo criterio de la utilización de anticuerpos monoclonales, al receptor de ratón FcγRIIIα. Se expresan en granulocitos, macrófagos y células NK (47), y también presentan baja afinidad por el ligando. Los reportes de su peso molecular abarcan desde 50 hasta 80 kDa (56). FcγRIII es muy denso, con unos cientos de miles en neutrófilos (56).

El mecanismo de fagocitosis a través de receptores Fc requiere de que el blanco esté cubierto totalmente por anticuerpo (40). El primer paso para la fagocitosis es la unión de la región Fc del anticuerpo enlazado al antígeno, al receptor, lo cual no significa necesariamente que haya una ingestión posterior (57). Esta unión es independiente del estado metabólico del fagocito, a diferencia de la ingestión, que es dependiente de este estado. Se supone que esta unión genera señales transmembranales que desencadenan simultáneamente la fagocitosis y la secreción de productos tendientes a la degradación del patógeno fagocitado,

como lo son intermediarios de oxidación (peróxidos y superóxidos) y metabolitos derivados del ácido araquidónico (58). La ingestión se realiza a través de un mecanismo denominado como "zipper" donde el blanco va siendo rodeado por el fagocito mediante una unión sucesiva de receptores a los anticuerpos que rodean al blanco, recordando al cierre de una cremallera (40). En caso de que el blanco no esté totalmente cubierto por anticuerpo, este proceso no puede llevarse a cabo.

Biología de las interleucinas 1 y 6.

Interleucina-6 (IL-6) es el nombre de una glicoproteína con peso de 24 kDA y una extensión de 212 aminoácidos, cuyo gene se localiza en el cromosoma 7. Su correspondiente en el ratón se conforma por 211 aminoácidos y su gene codifica desde el cromosoma 5. La homología entre ambas es, a nivel de DNA, de 65%; a nivel de proteína, 42% (59,60,61). IL-6 cruza, es decir la proteína humana es activa en células de ratón y viceversa.

La producción de IL-6 se da por diferentes tipos celulares: fibroblastos (62), células endoteliales (63), queratinocitos (64), células "mast" (65), líneas celulares T (66), monocitos/macrófagos (67) y una variedad de líneas tumorales. Esta producción es constitutiva (espontánea y constante) en algunos tipos celulares, pero en otros tipos requiere de un estímulo, como lo son: interleucina-1, factor de necrosis tumoral, virus, activadores de protein-kinasa C, y lipopolisacáridos bacterianos. En el sistema inmune el macrófago representa la mayor fuente de IL-6, siendo un mediador potencial importante de las interacciones macrófago-célula T.

Entre las primeras actividades reportadas para IL-6 se encuentran sus capacidades para hacer proliferar plasmacitomas e hibridomas de células B (66,68). Igualmente, es capaz de hacer proliferar células B normales y, sinérgicamente con IL-1, diferenciarlas induciéndolas para producir inmunoglobulinas del tipo G (69). Se ha reportado que IL-6 induce la proliferación de linfocitos T y diferenciar linfocitos T citotóxicos (70)

Existen evidencias de la participación de IL-6 como mediador de inflamación: estimula hepatocitos a producir proteínas de fase aguda, induce fiebre y sus niveles séricos aumentan considerablemente bajo este estado (71). En la hematopoyesis, soporta la proliferación de progenitores granulocitos/macrófagos y con IL-1 presenta efecto radioprotector. Además, se han reportado evidencias de que IL-6 soporta por sí misma, sin efecto sinérgico con otra citocina, la formación de colonias de macrófagos y granulocitos (72,73), aunque son todavía controversiales. Resulta interesante considerar que existe una alta homología entre IL-6 y el factor estimulador G-CSF (72), y que ha sido propuesto además que IL-6 es idéntico al factor MGI-2 (13).

Por su parte, interleucina-1 (IL-1) es el nombre genérico con que se denomina a dos péptidos diferentes (IL-1 α e IL-1 β), con puntos isoelectrónicos distintos de 5 y 7, respectivamente, que enlazan con un mismo receptor y se supone tienen las mismas propiedades biológicas (74,75). Los genes para ambas se localizan en el cromosoma 2 y contienen 7 exones, aunque su homología es sólo del 45 % (76,77). Las formas maduras consisten en polipéptidos de 14-17 kDa con una homología entre las dos formas

de aproximadamente 30 % (78). Existe heterogeneidad para la masa molecular de IL-1, pues se han encontrados formas de 22, 11, 4 y 2 kDa (79), de las cuales aun la forma de 4 kDa resultó activa (80). La fuente original de producción para IL-1 fue el sistema de células fagocíticas mononucleadas tales como células sanguíneas mononucleadas circulantes, macrófagos pulmonares alveolares, células hepáticas, macrófagos esplénicos, macrófagos peritoneales y células adherentes de médula ósea (81). Posteriormente se demostró que IL-1 es producida también por células no fagocíticas: fibroblastos sinoviales, queratinocitos, osteoclastos, astrocitos y células epiteliales (82).

La capacidad biológica de IL-1 es sumamente amplia pues presenta efectos en el sistema nervioso central (83), en el sistema vascular y en el tejido muscular (84), efectos citotóxicos (85), induce la proliferación de diversos tipos celulares (86,87). En el sistema inmune activa a linfocitos T y B (88), induce la secreción de anticuerpos por los células plasmáticas (89), e incrementa la capacidad citotóxica de macrófagos (90), entre otras funciones. En el sistema hematopoyético IL-1 produce neutrofilia, linfopenia, incrementa la producción de CSF, es radioprotectora, y prolifera y estimula progenitores hematopoyéticos (91). También se ha reportado su capacidad para inducir IL-1, interleucina-2, IL-3, IL-6, TNF, INF- γ e INF β (92).

Recientemente, se ha evidenciado por nuestro grupo de trabajo la capacidad de interleucina-1 para inducir la expresión de receptores para la Fracción cristalizante (receptores Fc) de las inmunoglobulinas tipo G en macrófagos normales y en líneas

celulares monocíticas y mielomonocíticas (93, Datos no publicados).

IL-1 e IL-6 son dos citocinas estructuralmente distintas, aunque están funcionalmente muy relacionadas. Su espectro biológico traslapa en varias actividades: ambas median la respuesta inflamatoria con un efecto sinérgico, ambas activan linfocitos T y B, y las dos presentan la capacidad de promover la hematopoyesis. Varias actividades requieren de ambas citocinas como cofactores (95,96). Además, varias de las actividades inicialmente reportadas para IL-1 ahora son asignadas a IL-6 (97); se sabe que IL-1 es un importante inductor para la producción de IL-6 (98).

Teniendo en cuenta que IL-6 está estructuralmente relacionado con los factores diferenciadores MGI-2 y con G-CSF, y funcionalmente con IL-1, en este trabajo evaluamos la capacidad de interleucina-6 para incidir en la diferenciación macrofágica. Específicamente, evaluamos la capacidad de interleucina-6 recombinante humana para inducir la expresión de receptores Fc en macrófagos pulmonares y peritoneales de ratón. Además, estudiamos si existía alguna relación entre esta citocina e IL-1 para llevar a cabo esta actividad, y finalmente, realizamos la determinación del tipo de receptor inducido por IL-6.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES.

1. Estudiar el efecto de interleucina-6 sobre la diferenciación de células macrofágicas normales de ratón.
2. Estudiar intereleucina-6 e interleucina-1 interactúan para diferenciar a células macrofágicas normales de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar si Interleucina-6 recombinante humana (rhIL-6) induce la expresión de receptores Fc en macrófagos pulmonares y peritoneales de ratón.
 - 1a. Evaluar la curva dosis-respuesta de interleucina-6 sobre macrófagos pulmonares y peritoneales de ratón.
 - 1b. Evaluar que tipo de receptor Fc induce rhIL-6 en macrófagos pulmonares y peritoneales de ratón.
2. Evaluar si rhIL-6 y rhIL-1 inducen sinérgicamente la expresión de receptores Fc en macrófagos peritoneales de ratón.
3. Evaluar si existe algún mecanismo de inducción indirecta de receptores Fc en macrófagos pulmonares y peritoneales de ratón entre rhIL-1 y rhIL-6.

METODO

Material Biológico

El material biológico utilizado en este trabajo consistió en ratones machos y hembras CD-1 de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del Bioterio de ENEP-Zaragoza C-II, UNAM.

Obtención de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón

Ratones CD-1 fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, se les practicó una incisión ventral en la piel, sin dañar el peritoneo, el cual quedó expuesto. Con la ayuda de una jeringa se le introdujeron 10 ml de solución salina de fosfatos (SAF) fría a la cavidad peritoneal. Después de retirar la jeringa se agitó firmemente la cavidad para lavarla. Con la misma jeringa se retiró la SAF y se colocó en un tubo para centrifuga frío. La operación fue repetida en una ocasión y los volúmenes colectados fueron centrifugados. Los botones celulares así obtenidos fueron resuspendidos en un volumen conocido de Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM del inglés Dulcco's Modified Eagle's Medium) (Sigma Co., EEUU.) y con la ayuda de un hemocitómetro (Clay-Adams, EEUU.) y un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) se determinó el número celular obtenido.

Posteriormente, las células resuspendidas fueron incubadas en DMEM para separar a los macrófagos de otros tipos celulares por adherencia.

Obtención de macrófagos pulmonares de ratón

Ratones CD-1 fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente, siempre bajo condiciones de esterilidad, se les efectuó una incisión torácica que dejó descubierta la cavidad pleural. Los pulmones fueron retirados y lavados superficialmente con DMEM para retirar restos de sangre, y se colocaron en DMEM limpio. Después de ello, fueron cortados en secciones de 1 a 3 mm y lavados mediante agitación magnética del medio. Este medio fue pasado a través de una malla de nylon para separar los macrófagos de las secciones de pulmón, y el volumen obtenido fue centrifugado a 800 rpm durante 5 min. El botón celular se componía en este momento de macrófagos con una importante contaminación por eritrocitos. Las células se resuspendieron en 3 ml de DMEM y se pasaron a través de un gradiente de densidad (1 ml de Ficoll Histopaque Sigma Chem. Co. EEUU.), y fue centrifugado durante 30 min a 800 rpm. Se obtuvo una banda blanca, que correspondió a los macrófagos la cual fue retirada y lavada en medio de cultivo. Los macrófagos fueron finalmente resuspendidos en DMEM para ser determinado el número celular a través de un hemocitómetro y un microscopio óptico.

Condiciones de cultivo

Una vez obtenidas las células, fueron incubadas en placas de cultivo de 96 pozos (Nuncion, Dinamarca) utilizando DMEM suplementado con 10% de suero de caballo (SC), que junto con los inductores dio un volumen de 200 μ l por pozo. Los macrófagos pulmonares se sembraron en un número de 1.5×10^5 por pozo. Para

sembrar los macrófagos residentes se incubó 6×10^5 de la población total obtenida del lavado peritoneal, por pozo, durante una hora para permitir la adherencia de los macrófagos, que fueron separados de las células no adherentes al retirar el medio. Después de esto, se adicionó el medio de cultivo suplementado y, en su caso, los inductores correspondientes.

Las células fueron incubadas durante dos días a 37°C en una atmósfera de humedad saturante y 15% de CO_2 . Todo experimento fue realizado por duplicado, y tuvo como control un par de pozos sin inductor, que denominamos negativo. Como control positivo se empleó Interferón γ (INF- γ) a una concentración de 100 unidades por ml (Genzyme Corp, EEUU.). En el caso de los macrófagos residentes Interleucina-1 (IL-1) fue una citocina conocida con capacidad de inducir la expresión de receptores Fc. IL-1, Interleucina-6 (IL-6), y M-CSF (del inglés Macrophage Colony Stimulating Factor) (Immunex, EEUU.) fueron probados con una concentración de 10 ng por ml. IL-6 fue probado además a varias concentraciones para establecer si su efecto era dosis-dependiente.

Ensayo para determinar la expresión de Receptores Fc

I. Preparación de eritrocitos cubiertos con anticuerpo (EA).

Fueron obtenidos eritrocitos de carnero y mantenidos en solución de Alsever en relación 1:1, para ser utilizados en un período desde 7 hasta 30 días después de su extracción. Se tomaron 0.5 ml de esta solución, homogenizada, y se llevaron a un

tubo para centrifuga. Se agregaron 2 ml de SAF y se resuspendió firmemente, para posteriormente centrifugar y separar los eritrocitos del SAF sobrenadante. Esta operación fue repetida dos veces, para eliminar eritrocitos lisados. El último botón obtenido fue resuspendido en una mezcla de 2 ml de SAF y 2ml de IgG de conejo dirigida contra eritrocitos de carnero (Cordis Lab., EEUU.) diluida 1:1600, y se incubó durante 30 min a 37 °C. Finalmente, los eritrocitos fueron lavados tres veces por resuspensión en SAF y centrifugación, y la resuspensión final fue en 2 ml de SAF.

II. Técnica de rosetas.

Después de haber cultivado a las células durante dos días con sus respectivos inductores, se procedió a retirar el medio de cultivo para adicionar 100 µl de medio fresco a los macrófagos residentes y 50 µl a los pulmonares. Con la ayuda de un pequeño gendarme se separó a las células del fondo del pozo de cultivo y se agregaron 10 y 5 µl de EA, a los macrófagos residentes y pulmonares, respectivamente. Las células en su conjunto fueron resuspendidas y posteriormente centrifugadas a 1800 rpm para formar un botón que fue incubado durante 30 min a 37 °C. Pasado este tiempo, cada botón fue resuspendido, se aplicó una muestra a un hemocitómetro y con la ayuda de un microscopio óptico se contó al azar 100 células para determinar el porcentaje de formación de rosetas, que consisten en la unión de dos o más eritrocitos a una célula macrofágica.

Empleo de anticuerpos.

Se emplearon anticuerpos dirigidos contra IL-1 β y contra IL-6 (Immunex Corp., EEUU.). Estos anticuerpos se adicionaron desde el inicio del cultivo, junto con citocinas inductoras, en una concentración de 1 μ L de una dilución de 1:200.

También fueron empleados anticuerpos dirigidos contra los receptores Fc tipos I y II (Medarex Corp., EEUU.). Estos anticuerpos se agregaron después de la incubación de los macrófagos con los respectivos inductores, 30 minutos antes de evaluar el ensayo. Durante esos 30 min estuvieron presentes en una concentración de 1 μ g/ml a 37 °C. Esta concentración es una concentración saturante pues con solo 0.3 μ g/mL se debe bloquear a los receptores.

RESULTADOS

Con el objeto de contribuir al conocimiento básico de la participación de IL-6 como reguladora de la diferenciación mielóide, determinamos la capacidad de esta citocina para inducir receptores Fc (Rfc) en macrófagos pulmonares y residentes de la cavidad peritoneal de ratón, así como una posible interacción con IL-1 para llevar a cabo esta actividad.

La Interleucina-6 es un factor diferenciador en macrófagos pulmonares.

Obtuvimos una población de macrófagos pulmonares de ratón con un 88% de pureza y un 92% de viabilidad, mediante un lavado de fragmentos de tejido pulmonar y una posterior separación de células rojas a través de un gradiente de densidad. Procedimos a evaluar en este tipo de células el efecto de la IL-6 como inductor de receptores Rfc. Para ello, cultivamos 1.5×10^5 macrófagos por pozo, con un volumen final de 200 μ L de medio suplementado con suero, en presencia de 10 ng de interleucina-6 recombinante humana (IL-6). Como controles positivos se utilizaron 100 U/ml de interferón- γ (INF γ) y 10 ng/ml de interleucina-1 (IL-1). Además, se emplearon 10 ng de factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) como factor diferenciador inespecífico. Como control negativo se empleó medio de cultivo sin inductor.

Los resultados obtenidos demuestran que la IL-6 es un inductor de Rfc en macrófagos pulmonares (22%) más fuerte que la IL-1 (15%) y el INF γ (16%), los cuales ya habían sido descritos

anteriormente como responsables de la generación de este tipo de receptores (93,94,48). Asimismo, contrariamente a lo esperado, el M-CSF también estimuló de manera importante la expresión de este tipo de receptores (13.5%) (Gráfica I).

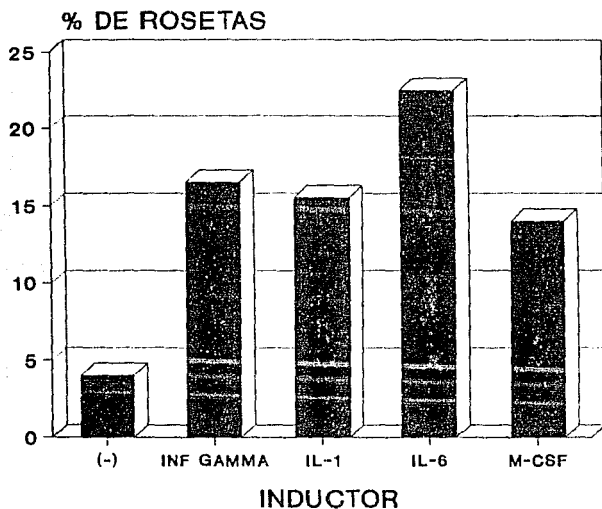
Consideramos que estos resultados son importantes porque demuestran que IL-6 no sólo posee, como ya ha sido publicado, actividad proliferadora sobre el linaje monocito-macrófago, sino además diferenciadora en lo referente a inducir la expresión de receptores inmunológicos. Esta es pues una actividad importante de tipo biológico no descrita anteriormente.

La Interleucina-6 induce la expresión de receptores Fc en macrófagos pulmonares de manera dosis-dependiente.

Una vez que determinamos que la IL-6 es una molécula capaz de inducir la expresión de RFC en macrófagos pulmonares de ratón, procedimos a determinar si este efecto era dosis-dependiente. Para ello, sembramos 1.5×10^5 macrófagos pulmonares por pozo, utilizando 100 U/ml de INF- γ como control positivo y diferentes concentraciones de IL-6 en pozos por separado (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 4, 8, y 16 ng/ml).

Los resultados obtenidos muestran que a una concentración de 0.4 ng/ml de IL-6, inclusive mucho menor a la utilizada en los primeros ensayos (10 ng/ml), se alcanza una respuesta óptima en la inducción para RFC. Además, estos resultados indican que la expresión de estos receptores es dosis-dependiente, y se alcanza una saturación en la inducción por encima de 0.4 ng de IL-6 (Gráfica II).

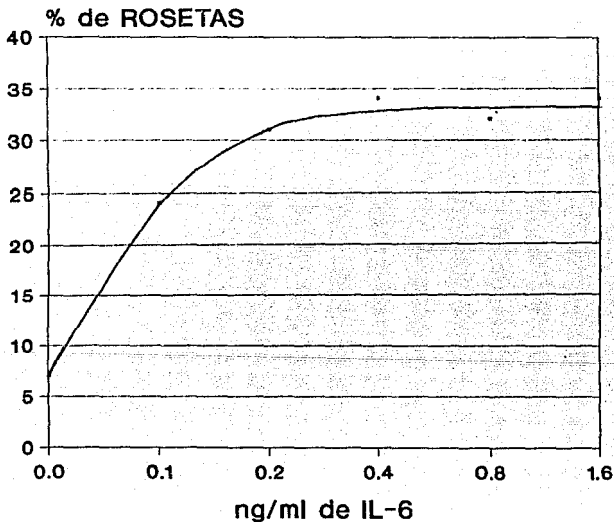
INDUCCION DE RFc EN MACROFAGOS PULMONARES DE RATON



GRAFICA I

(-): CONTROL NEGATIVO; INF GAMMA: INTERFERON GAMMA RECOMBINANTE DE RATON (100 U/ML); IL-1: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA (10 NG/ML); IL-6: INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA (10 NG/ML); M-CSF: FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACROFAGOS RECOMBINANTE HUMANO (10 NG/ML).

DOSIS-RESPUESTA DE RF_c EN MACROFAGOS PULMONARES DE RATON POR IL-6



GRAFICA II

IL-6: INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA EN VARIAS CONCENTRACIONES.

La Interleucina-6 induce la expresión de receptores Fc en otras poblaciones de macrófagos.

Una vez que habíamos demostrado que IL-6 inducía la expresión de RFC en macrófagos pulmonares, decidimos estudiar si esta propiedad podía presentarse en otro tipo de macrófagos.

Con esta finalidad, se cultivaron aproximadamente 6×10^5 macrófagos residentes de cavidad peritoneal en presencia de 10 ng/ml de IL-6. Como controles positivos se utilizaron 10 ng/ml de IL-1, 100 U/ml de INF γ y 10 ng/ml de M-CSF como factor diferenciador.

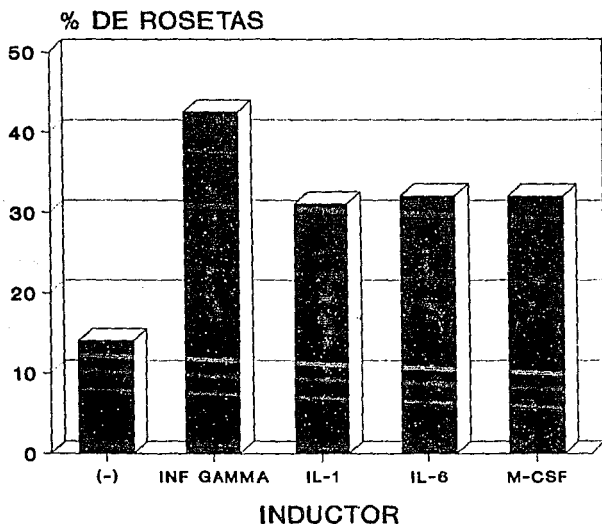
Nuevamente, IL-6 tuvo un efecto importante en la inducción de RFC (30% comparado con el control). Sin embargo, dicha expresión no fue mayor que la producida por INF γ (40%), aunque fue semejante a la inducida por IL-1 y por M-CSF (Gráfica III).

La IL-6 induce también la expresión de receptores Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de manera dosis-dependiente.

Debido a que IL-6 tuvo la capacidad de inducir la expresión de receptores para Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, quisimos estudiar si esta propiedad diferenciadora era dosis-dependiente.

Con esta finalidad, sembramos la misma cantidad celular arriba citada en cada pozo de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de IL-6 (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 8 ng/ml). Como control negativo se sembraron células macrofágicas en ausencia de inductor y como control positivo 100 U/ml de INF γ .

INDUCCION DE RF_c EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON POR IL-6



GRAFICA III

(-): CONTROL NEGATIVO; INF GAMMA: INTERFERON GAMMA RECOMBINANTE DE RATON (100 U/ML); IL-1: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA (10 NG/ML); IL-6: INTERLEUCINA-6 RECOMBINANTE HUMANA (10 NG/ML); M-CSF: FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACROFAGOS RECOMBINANTE HUMANO (10 NG/ML).

Los resultados obtenidos demuestran que IL-6 induce la expresión de RfC de manera dosis-dependiente, análoga a la encontrada con macrófagos alveolares, y que solamente se necesitan 0.05 ng/ml de este inductor para que se obtenga una respuesta óptima (Gráfica IV).

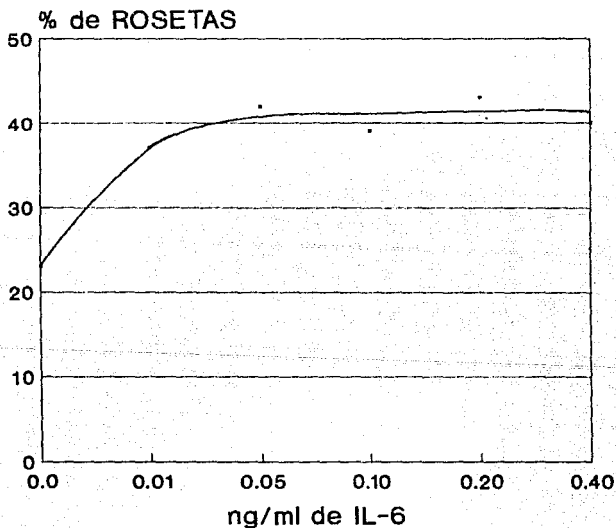
Es importante comentar, que esta concentración óptima de inducción, es equivalente con los valores fisiológicos reportados para esta molécula.

Existen diferentes mecanismos de inducción de receptores Fc por IL-1 y la IL-6 en macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón.

Teniendo en consideración que previamente había sido descrito por nuestro grupo que la IL-1 tiene la capacidad de inducir la expresión de receptores Fc en células leucémicas (93) y normales de ratón (94) y, debido a que en este trabajo se dan evidencias de que la IL-6 también tiene la misma propiedad, decidimos estudiar si el efecto producido por alguno de estos factores era consecuencia de la acción indirecta de alguno de ellos. Con esta finalidad, se sembraron 6×10^5 macrófagos de la cavidad peritoneal en presencia de 0.05 ng/ml de IL-6 simultáneamente con 1 ng/ml de anticuerpo policlonal contra la IL-1 (α IL-1). En otro experimento por separado se adicionó a el mismo número de macrófagos 1 ng/ml de IL-1 junto con 1 ng/ml de anticuerpo policlonal contra la IL-6 (α IL-6).

Como control positivo se utilizó 100 U/ml de $INF\gamma$, además de 0.5 ng/ml de IL-6 y 1 ng/ml de IL-1 en ausencia de anticuerpos policlonales dirigidos contra IL-1 e IL-6.

DOSIS-RESPUESTA DE RF_c EN MACROFAGOS PULMONARES DE RATON POR IL-6



GRAFICA IV

IL-6: INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA EN VARIAS CONCENTRACIONES.

Los resultados obtenidos parecen indicar que es necesaria la presencia de tanto IL-1 e IL-6 para que la inducción de Rfc se lleve a cabo (Gráfica V).

Consideramos sin embargo no hay que perder de vista que los anticuerpos policlonales utilizados contra la IL-6 (α IL-6) y contra la IL-1 (α IL-1) poseen una porción Fc que puede ser reconocida por el receptor presente en macrófagos residentes, por lo tanto el abatimiento provocado cuando se utilizan los anticuerpos contra la IL-1 y la IL-6 puede deberse a la unión inespecífica de su porción Fc al receptor respectivo presente en la membrana de los macrófagos residentes.

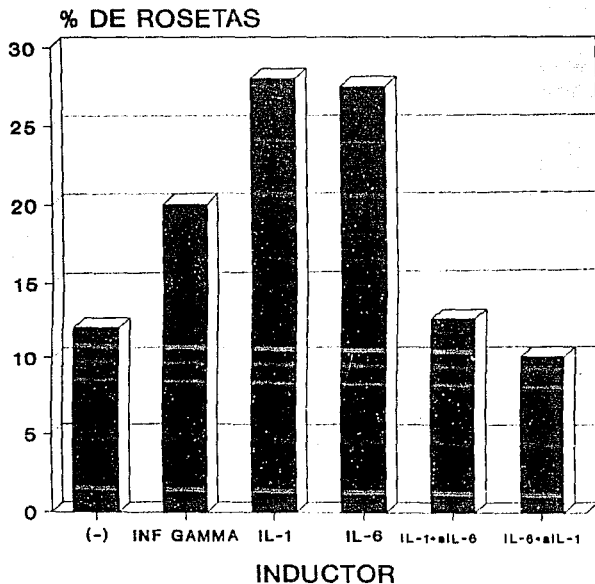
La IL-6 y la IL-1 no actúan de manera sinérgica en la inducción de los receptores para Fc en macrófagos residentes.

Es conocido que cuando se estimula a células macrofágicas con la IL-1, estas células secretan a su vez IL-6 (99). Asimismo, ha sido reportado que tanto la IL-1 y la IL-6 comparten muchas propiedades biológicas en las células efectoras sobre las que inciden (95-97).

Tomando en cuenta estos datos, decidimos estudiar si la IL-6 tenía algún efecto sinérgico en la inducción de Rfc cuando se co-cultivaba en presencia de la IL-1 o viceversa.

Con esta finalidad, se sembraron 6×10^5 macrófagos residentes por pozo de cultivo, en presencia de 100 U/ml de INF- γ como control positivo. También se sembraron macrófagos en presencia de 0.05 ng/ml de IL-6, en presencia de 1 ng/ml de IL-1 y finalmente, en otros pozos se sembraron macrófagos en presencia de 0.05 ng/ml de IL-6 simultáneamente con 1 ng/ml de IL-1.

ANTI-IL-1 Y ANTI-IL-6 BLOQUEAN RF_c INDUCIDOS POR IL-6



GRAFICA V

(-): CONTROL NEGATIVO; INF GAMMA: INTERFERON GAMMA RECOMBINANTE DE RATON 100 U/ML; IL-1: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA (1 NG/ML); IL-6: INTERLEUCINA-6 RECOMBINANTE HUMANA (0,1 NG/ML); IL-1+ANTI-IL-6: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA CON ANTI-IL-6; IL-6+ANTI-IL-1: INTERLEUCINA-6 RECOMBINANTE HUMANA CON ANTI-IL-1.

Los resultados obtenidos indican que la IL-6 y la IL-1 no tienen efecto sinérgico en la inducción de RFC, pues ambas juntas inducen valores muy similares de RFC a los encontrados cuando actúan por sí solas (Grafica VI).

La IL-6 no induce receptores para Fc del tipo I y del tipo II en macrófagos residentes.

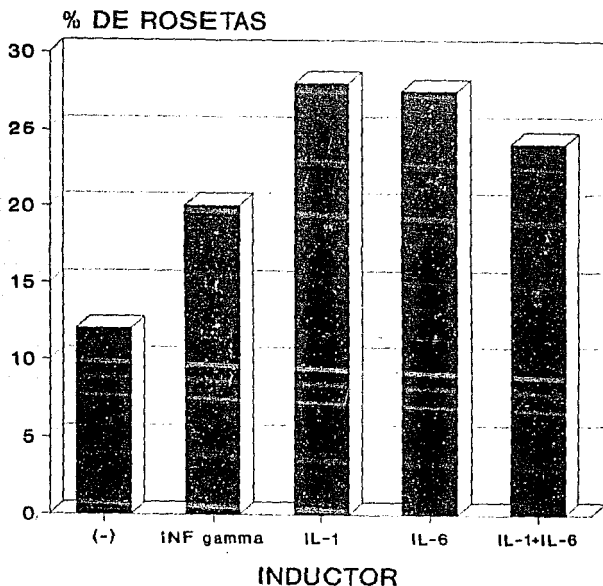
Se han identificado tres tipos de receptores Fc, denominados: RFcI, RFcII y RFcIII, que están presentes en las células del linaje monocito-macrófago.

Como en este trabajo se dan evidencias de que la IL-6 induce la expresión de receptores Fc en células macrofágicas, decidimos estudiar que tipo de RFC inducía la IL-6 sobre macrófagos residentes.

Para ello, se sembraron 6×10^5 macrófagos residentes por pozo de cultivo en presencia de 100 U/ml de INF- γ como control positivo. En pozos por separado se adicionó 0.05 ng/ml de IL-6 (se prepararon 6 pozos en lugar de 2) y como control negativo, en otros pozos se adicionó solamente medio de cultivo sin inductor.

Los macrófagos peritoneales con los inductores ya mencionados, o sin inductor, se incubaron por espacio de dos días. 30 min antes de la evaluación del rosetaje se incubaron 2 de los 6 pozos que tenían 0.05 ng/ml de IL-6, con 1 μ g/ml de anticuerpo policlonal dirigido contra el receptor para Fc del tipo I (α RFcI), y otros dos pozos con la misma concentración pero del anticuerpo policlonal dirigido contra el receptor para Fc del tipo II (α RFcII).

IL-1 E IL-6 NO SINERGIZAN PARA INDUCIR LA EXPRESION DE RFc EN MACROFAGOS PERITONEALES



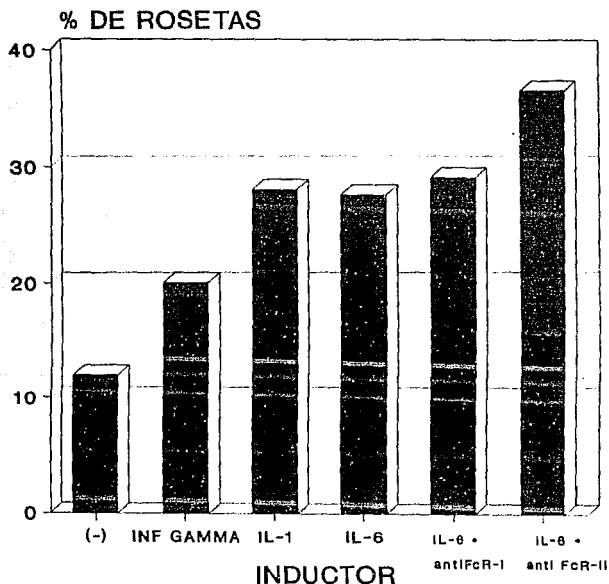
GRAFICA VI

(-): CONTROL NEGATIVO; INF GAMMA: INTERFERON GAMMA RECOMBINANTE DE RATON (100U/ML); IL-1: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA (1 NG/ML); IL-6: INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA (0,1 NG/ML); IL-1+IL-6: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA (1 NG/ML) SIMULTANEAMENTE CON INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA (0,1 NG/ML).

En la gráfica VII se observa que ninguno de los anticuerpos dirigidos contra el RFcI y del RFcII bloquean la inducción de los receptores para Fc en macrófagos residentes. Incluso se observó un ligero incremento en la expresión de RFc cuando se co-incubó IL-6 con α RFcI o con IL-6 en presencia de α RFcII (29% y 37% respectivamente).

Estos resultados nos hacen suponer que la inducción de la IL-6 de los RFc en macrófagos residentes no son del tipo I ni del II. Sin embargo, el hecho de que el α RFcII haya incrementado la expresión de RFc en este tipo celular, estaría indicando una modulación en la expresión de estos receptores, en la cual la presencia del α RFcII indujera la sobreexpresión de los RFcI o de los RFcIII y, esto se viera reflejado en un incremento en el porcentaje de cualquiera de estos dos tipos de receptores (Gráfica VII).

DETERMINACION DE LOS TIPOS DE Rf_c INDUCIDOS POR IL-6.



GRAFICA VII

(-) CONTROL NEGATIVO; INF GAMMA: INTERFERON GAMMA RECOMBINANTE DE RATON (100 U/ML); IL-1: INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA (1NG/ML); IL-6: INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA (0,1 NG/ML); IL-6+ANTI FcR-I; INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA Y ANTICUERPO CONTRA RECEPTOR Fc TIPO I; IL-6+ANTI FcR-II: INTERLEUCINA 6 RECOMBINANTE HUMANA Y ANTICUERPO CONTRA RECEPTOR Fc TIPO II.

DISCUSION

El sistema fagocítico mononuclear es una de las defensas primarias del organismo debido a su capacidad para fagocitar microorganismos, células caducas y agentes patógenos en general, a través de diversos receptores de membrana, como lo son: receptores para oligosacáridos, receptores para el complemento y receptores para la fracción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas tipo G (40).

Esta actividad, junto con otras capacidades del sistema monocito-macrófago, son dependientes de su estado de diferenciación y de activación, que a su vez son determinadas, entre otros aspectos, por la presencia de factores humorales, generalmente de carácter glicoproteico (11).

En este sentido, IL-6 ha sido descrita como una molécula capaz de incidir en el desarrollo de las células mieloides, aunque su papel exacto en la regulación de la proliferación y diferenciación mieloides aún no ha sido determinada totalmente.

Con la finalidad de contribuir a este conocimiento, evaluamos la capacidad de IL-6 para incidir en la diferenciación macrofágica, induciendo la expresión de receptores Fc (RfC).

Los resultados obtenidos por el presente estudio, dan evidencias de que efectivamente, la IL-6 induce la expresión de RfC en macrófagos pulmonares de ratón (Gráfica I), y que este efecto es dosis-dependiente (Gráfica II). El hecho de que IL-6 sea una molécula capaz de inducir in vitro la expresión de RfC en células macrofágicas de ratón, abre una nueva expectativa en la posibilidad de regular la expresión de mecanismos inmunes, como

lo es la expresión de receptores inmunológicos, tanto para individuos sanos como en estados patológicos de una manera menos agresiva que las técnicas terapéuticas que se utilizan en la actualidad como son la radioterapia y la quimioterapia, entre otras.

Una de los principales causas de mortalidad en nuestro país se debe a padecimientos de tipo leucémicos, especialmente en niños (94), que se caracterizan por la proliferación excesiva de los clones celulares que han escapado a los mecanismos de diferenciación celular. Actualmente, el tratamiento de estas enfermedades se efectúa mediante la destrucción de las células malignas, que conlleva un grave daño para las células normales, y para el paciente en general. Resulta pues, sumamente atractiva la idea de utilizar mediadores biológicos, que están normalmente presentes en el organismo, para diferenciar a las células leucémicas sin causar un daño posterior al organismo. Podemos pensar en estos modificadores biológicos por lo menos como un paliativo a dichas enfermedades puesto que la leucemia trae como consecuencias un abatimiento sumamente importante de las defensas inmunes. Sin embargo, esta es una posibilidad a futuro, que requiere de más estudios para llegar a una fase de aplicación clínica..

Por otro lado, es conveniente remarcar que las contribuciones de investigación básica profundizan en nuestro conocimiento de la forma en que se llevan a cabo los procesos biológicos normalmente, y ésta puede ser además la pauta para comprender entonces cómo se dan los procesos patológicos.

Asimismo, como se esperaría, el efecto mostrado por IL-6 en la

inducción de receptores-Fc en macrófagos pulmonares fuera dosis-dependiente, como ocurre para las actividades de muchas citocinas. Sin embargo, es importante comentar que se encontró que se alcanzaba una inducción óptima de los RfC inclusive con concentraciones mucho menores a las utilizadas en los primeros ensayos de inducción: 0.4 ng/ml, que representa aproximadamente 25 veces menos concentración a la empleada inicialmente, 10ng/ml.

Es apropiado mencionar también, que la concentración óptima encontrada se halla dentro del intervalo de los valores fisiológicos detectados de la IL-6 en el suero tanto en animales como en el humano, las cuales se encuentran en el rango de los pico-gramos.

El hecho de que la inducción de receptores Fc por la IL-6 se dió tanto en macrófagos peritoneales como en macrófagos pulmonares, sugiere que esta molécula puede tener un efecto más generalizado en otras poblaciones del linaje monocito-macrófago, independientemente de su ubicación en el organismo.

Cabe resaltar que las dos poblaciones macrofágicas estudiadas en el presente trabajo presentan importantes diferencias en cuanto a su metabolismo. Los macrófagos pulmonares constituyen una población constantemente enfrentada a agentes patógenos debido a su ubicación en el organismo, en tanto que los macrófagos residentes son una población que puede permanecer en un estado de menor activación. Esto conduce a diferencias que se reflejan en características tales como el metabolismo energético, capacidad fagocítica y la densidad de receptores de superficie (33-37).

Es notable el hecho de que al realizar la curva dosis-respuesta

del efecto inductor de receptores-Fc por IL-6 en este tipo celular, la concentración óptima encontrada fue de tan sólo 0.05ng/ml, 200 veces menos que la cantidad inicialmente empleada por nosotros para inducir Rfc. Esta concentración es también, aproximadamente 16 veces menor que la dosis óptima reportada anteriormente para la inducción de Rfc por IL-1 en macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón (94), lo que puede ser importante teniendo en mente una aplicación clínica, pues requeriría de una menor dosis, con una menor probabilidad de efectos colaterales.

Es conocido que los macrófagos cuando son estimulados con la IL-1 secretan IL-6 (98). Teniendo en consideración que nuestro grupo ha reportado que la IL-1 induce la expresión de Rfc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, creímos conveniente estudiar si la expresión de los Rfc inducida por la IL-6 en este tipo celular, no se debía a la secreción por parte de los macrófagos de IL-1, o viceversa.

Como se muestra en la Gráfica V, al utilizar los anticuerpos policlonales dirigidos contra la IL-1 (α IL-1) en cultivos donde se encontraba presente la IL-6 y contra la IL-6 (α IL-6) en cultivos donde se encontraba presente la IL-1, ambos anticuerpos inhibieron la expresión de los Rfc (Gráfica V). Estos resultados sugieren que es necesaria la presencia tanto de IL-1 como de IL-6 para que finalmente se de la expresión de Rfc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón. Sin embargo, consideramos que en esta inhibición no puede excluirse que este efecto se deba al bloqueo del receptor para Fc presente en los macrófagos residentes, por la porción Fc de estos anticuerpos.

Sería conveniente emplear "anticuerpos" que sólo portaran la región Fab y no portaran la región Fc.

De la misma manera se ha reportado que la IL-6 comparte muchas propiedades biológicas con la IL-1 (95-97), además de que nuestro grupo ha demostrado que esta molécula induce también Rfc en macrófagos peritoneales, entre otros tipos de células macrofágicas (Datos no publicados-95), quisimos estudiar si en macrófagos residentes el co-cultivo de la IL-6 y la IL-1 sinergizaba en la inducción de los Rfc (Grafica VI).

De acuerdo a los resultados obtenidos no existe efecto sinérgico de la IL-6 y de la IL-1, sobre macrófagos residentes, debido a que los valores obtenidos con estos factores por separado (28% tanto para la IL-1 como para la IL-6), fue muy similar a los encontrados cuando se co-cultivaron ambas (24%). Es importante comentar que en estos experimentos se utilizó siempre la concentración óptima de la IL-6 determinada de su respectiva curva dosis-respuesta.

Tales resultados nos llevan a pensar que existe algún mecanismo o mecanismos que regulan una expresión máxima limitada de Rfc mediada por estas dos moléculas. Es probable que exista una modulación entre los receptores para estas citocinas que dé como resultado final una inducción de Rfc. Sin embargo, algo más probable es que la población macrofágica en estudio tenga un número determinado de células que sean capaces de ser inducidos a expresar Rfc. Este valor máximo sería alcanzado a través de la inducción de IL-6 e IL-1 por sí solas, y no sería superado aun con el estímulo de IL-1 e IL-6 simultáneamente.

Se han identificado 3 tipos de receptores para Fc presentes en

la membrana celular de las células pertenecientes al linaje monocito-macrófago, los cuales se han denominado como RFcI, RFcII y RFcIII (47). Como en este trabajo se dan evidencias de que la IL-6 induce la expresión de receptores Fc, quisimos estudiar cual era el tipo de RFc que inducía esta molécula sobre macrófagos residentes (Gráfica VII).

Los resultados obtenidos, de acuerdo a nuestras condiciones, parecen indicar que la IL-6 no induce receptores para Fc del tipo I ni del tipo II, debido a que los anticuerpos utilizados contra estos receptores (α RFcI y α RFcII) no bloquean la expresión de los RFc sobre los macrófagos residentes (Gráfica VII). Estos resultados parecen indicar que la IL-6 induce receptores para el tipo III (RFcIII).

Estos resultados son interesantes, teniendo en consideración que la molécula que se ha reportado más ampliamente hasta ahora como inductora de receptores Fc en células mieloides, que es el interferón- γ (48), induce RFc del tipo I, según uso de anticuerpos policlonales. Por otro lado, la molécula que han sido descritas recientemente por nuestro laboratorio como inductoras de RFc, el FcRI e IL-1 (que posiblemente sean una misma molécula), inducen receptores del tipo I y II. El hecho de que IL-6 induzca un receptor de tipo diferente (tipo III) establecería un fenómeno de complementación de actividades, donde cada molécula induciría la expresión de un tipo diferente de RFc, dependiendo de la necesidad inmune de ese momento, puesto que se ha sugerido que las diferencias estructurales de los diferentes tipos de RFc trae como consecuencia diferentes actividades.

Los resultados nos sugieren también un fenómeno de modulación

de la expresión de RfC, mediada a través de los anticuerpos empleados en estos experimentos. Esto se basa en el hecho de que los anticuerpos anti-FcR además de no bloquear la expresión de receptores indujeron un incremento en la formación de rosetas Fc. Se ha reportado que los anticuerpos son capaces de modular la expresión de los RfC (99). En este caso, se trataría de un modulación positiva donde el bloqueo de un tipo de RfC (en este caso el tipo II), induciría a una sobreexpresión de otros tipos de receptores, ya sea del tipo I o del tipo III.

Consideramos que los resultados aquí presentados establecen de manera clara el papel que tiene la IL-6 en la inducción de receptores Fc en células del linaje monocito-macrófago. Sería de interés evaluar si la IL-6 ejerce el mismo efecto inductor en células fagocíticas humanas, además de estudiar si puede inducir la expresión de este tipo de receptores en células leucémicas porque esto tendría evidentemente, implicaciones clínicas .

BIBLIOGRAFIA

1. McKenzie, S.B.: Textbook of Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1988.
2. Dexter, T.M., Spooncer, E.: Growth and differentiation in the haemopoietic system. *Ann Rev Cell Biol.* 3:423, 1987.
3. Dexter, T.M.: Haemopoietic growth factors. *Brit Med Bull.* 45:337, 1989.
4. Till, J.E.; McCulloch, E.A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Radiat Res.* 14:213, 1961.
5. Paul, J.: Cell and tissue culture. Ed. Churchill Livingstone, Gran Breteña, 1973.
6. Bradley, T.R.; Summer, M.A.: Stimulation of mouse bone marrow colony growth *in vitro* by conditioned medium. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 46:607, 1966.
7. Metcalf, D.: The hemopoietic Colony stimulating factors. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1984.
8. Suda, J.; Suda, T.; Ogawa, M.: Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replacement of paired progenitors. *Blood.* 64:393, 1984.
9. Wolf, M.S.; Trentin, J.J.: Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp Med.* 127:205, 1968.
10. March, C.; Mosley, B.; Larsen, A.; Cerreti, D.; Braedt, G.; Price, V.; Henney, C.; Kronheim, S.; Grabstein, K.; Conlon, P.; Hopp, T.; Cosman, D.: Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNA. *Nature.* 315,641, 1985.
11. Klingemann, H.G.; Eaves, C.J.: Colony Stimulating Factors. *Bone Marrow Transplant.* 3:177, 1988.
12. Pluznick, D.H., Sachs, L.: The cloning of normal mast cell in tissue culture. *J Cell Com Physiol.* 66:319, 1968.
13. Shabo, Y.; Lotem, J.; Rubistein, M.; Revel, M.; Clark, S.C.; Wolf, Stanley, F.; Kamen, R.; Sachs, L.: The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. *Blood.* 72:2070, 1988.
14. Bradley, T.R.; Metcalf, D.: The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 44:287, 1966.
15. Ihle, J.N.; Keller, J.; Henderson, L.; Klein, F.; Palaszynski, E.: Procedures for the purification of interleukin-3 to homogeneity. *J Immunol.* 129:2431, 1982.

16. Burgess, A.W.; Metcalf, D.: The effect of colony stimulating factor on the synthesis of ribonucleic acid by mouse bone marrow cells *in vitro*. *J Cell Physiol.* 90:471, 1977.
17. Nicola, N.A.; Metcalf, D.; Matsumoto, M.; Johnson, G.R.: Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. *J Biol Chem.* 258:9017, 1983.
18. Lee, F.; Yokota, T.; Chiu, C.P.; de Vries, J.; Banchereau, N.; Arai, N.; Coffman, R.; Rennick, D.; Arai, K.: The molecular cloning of interleukin 4,5 and 6: Multifunctional hemopoietic growth factors. *Behring Inst Mitt.* 83:8,1988.
19. Henney, C.S.: The interleukins as lymphocyte growth factors. *Transplantation Proceedings.* 21:22, 1989.
20. Metcalf, D.: The granulocyte macrophage colony stimulating factors. *Science.* 229:16,1985.
21. Cline, M.J.; Summer, M.A.: Bone marrow macrophage precursors. I. Some functional characteristic of the early cells of the mouse macrophage series. *Blood* 40:62, 1972.
22. Zucker-Franklin, D.; Greaves, M.F.; Grossi, C.E.; Marmont, A.M.: *Atlas of Blood Cells.* Ed. Ermes, 1988.
23. Weissman, G.; Dukor, P.: The role of lisosomes in immune response. *Adv Immunol.* 12:283, 1970.
24. Nathan, C.F.: Secretory Products of macrophages. *J Clin Invest.* 79:319,1987.
25. Werb, Z.: How the macrophage regulate its extracellular environment. *Am J Anat.* 166:237, 1983.
26. Brain, J.D.: Physiology and pathophysiology of pulmonary macrophages, in: *The Reticuloendothelial System. A comprehensive treatise. Vol 7B Physiology.* Reichard S.M. and Filkins J.P. eds. Plenum Press, New York, 1985.
27. Shellito, J.; Esparza, C.; Armstrong, C.: Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. The roles of monocyte influ: and alveolar macrophage proliferation *in situ*. *Am Rev Respir Dis.* 135:78, 1987.
28. Eckert, H.; Lux, M.; Lachmann, B.: The role of alveolar macrophages in surfactant turnover. *Lungs.* 161:213, 1983.
29. Sorokin, S.F.: Dynamics of lisosomal elements in pulmonary alveolar macrophages. I. The postactivation lysosomal cycle. *Anat Rec.* 206:117,1983.

30. Dauber, J.H.; Holian, A.; Rosmiller, M.E.; Daniel, R.P.: Separation of bronchoalveolar cells from the guinea pig on continuous density gradients of Percoll: Morphology and cytochemical properties of fractionated lung macrophages. *J Reticuloendothelial Soc.* 33:119, 1983.
31. Padawer, J.: The peritoneal cavity as a site for studying cell-cell and cell-virus interactions. *J Reticuloendothel Soc.* 14:462, 1973.
32. van Furth, R.: Origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 128:415, 1976.
33. Karnovsky, M.L.; Lizzins, J.; Drath, D.; Harper, A.: Biochemical characteristics of activated macrophages. *Ann NY Acad Sci.* 256:266, 1975.
34. Karnovsky, M.L.; Simmons, S.; Glass, E.A.; Shafer, A.W.; Heart, P.D.: Metabolism of macrophages, en: *Mononuclear Phagocytes*. Ed. Van furth, Blackwell Scientific Publications, 1970.
35. Pavilladr, E.R.J.: *In vitro* phagocytic and bactericidal ability of alveolar and peritoneal macrophages of normal rats. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 41:265, 1963.
36. Leake, E.S.; Gonzalez-Ojeda, D.; Myrvik, O.N.: Enzymatic differences between normal alveolar macrophages and Oil-influenced peritoneal macrophages obtained in the rabbits. *Exp Cell Res.* 33:553, 1964.
37. Rhodes, J.: Macrophage heterogeneity in receptor activation of macrophage Fc receptor *in vivo* and *in vitro*. *J Immunol.* 114:976, 1975.
38. Paul, J.: *Fundamental Immunology*. Raven Press ed., 1988
39. van Furth, R.; Cohn, Z.A.; Hirsch, J.G.; Humprey, J.H.; Spector, W.G.; Langevoort, H.L.: The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *WHO Bull.* 46:845, 1972.
40. Wright, S.D.; Silverstein, : Overview: The function of receptors in phagocytosis. En: *Handbook of Experimental Immunology*, V2. D.M.Weir, ed. Blackwell Scientific Publication, 1986.
41. Wasserman, R.L.; capra, J.D.: Immunoglobulins. En: *The glycoconjugates*, M.I. Horowitz & W. Pigman, ed. Academic Press, N.Y., 1977.
42. Hilschmann, N. Craig, L.C.: Amino acid sequence studies with Bence Jones proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 53:1403, 1965.

43. Porter, R.R.: The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* 73:119, 1959.
44. Unkeless, J.C.; Fleith, H.; Mellman, I.S.: Structural aspects and heterogeneity of immunoglobulin Fc receptors. *Adv Immunol.* 32:247, 1981.
45. Knyszynski, A.; Lebovich, S.J.; Danon, D.: Phagocytosis of "old" red blood cells by macrophages from syngenic mice *in vitro*. *Exp Hematol.* 5:480, 1977.
46. Ezekowitz, R.A.B.; Bompton, M.; Gordon, S.: Macrophage activation selectively enhances expression of Fc Receptors for IgG2a. *J Exp Med.* 157:807, 1983.
47. Ravetch, J.V.; Anderson, C.L.: FcγR Family: Proteins, transcripts, and genes, in: Fc receptors and the action of antibodies. Henry Metzger, ed. American Society for microbiology, Washington, D.C., 1990.
48. Perussia, B.; Dayton, E.T.; Lazarus, R.; Fanniny, V.; Trinchieri, G.: Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med.* 158:1092, 1983.
49. Anderson, C.L.: Isolation of the receptor for IgG from human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. *J Exp Med.* 156:1794, 1982.
50. Lane, B.C.; Mitchell, J.K.; Mitchell, M.S.; Cooper, S.M.: Structural evidence for distinct IgG subclass-specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med.* 152:1147, 1980.
51. Anderson, C.L.; Abraham, N.G.: Characterization of the Fc receptor for IgG on human macrophage cell line, U937. *J Immunol.* 125:2735, 1980.
52. Unkeless, J.C.; Eisen, H.N.: Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptor of mouse macrophages. *J Exp Med.* 142:1520, 1975.
53. Cohen, L.; Sharp, S.; Kulczycki Jr, A.: Human monocytes, B lymphocytes and non-B lymphocytes each have structurally unique Fc receptors. *J Immunol.* 131:378, 1983.
54. Mellman, I.S.; Unkeless, J.C.: Purification of a functional mouse Fc receptor through the use of a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 152:1048, 1980.
55. Karas, S.P.; Rose, W.F.; Kurlender, R.J.: Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood* 60:1277, 1982.

56. Fleit, H.B.; Wriqht, S.D.; Unkeless, J.C.: Human neutrophil Fc receptor distribution and structure. Proc Natl Acad Sci USA. 79:3275, 1982.
57. Rabinovitch, M.: The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. Exptl Cell Res. 46:19, 1967.
58. Silverstein, S.C.; Greenberg, S.; Di Virgilio, F.; Steinberg, T.H.: Phagocytosis. Ed: Paul, W.E., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989.
59. Shegal, 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 β 2 interferon gene. Proc Natl Acad Sci USA. 84:3633, 1987.
60. Simpson, R.J.; Moritz, R.L.; Rubira, M.R.; Van Snick, J.: Murine hybridoma/plasmacytoma growth factor: complete amino acid sequence and relation to human interleukin-6. Eur J Biochem. 176:187, 1988.
61. Mock, B.A.; Nordan, R.P.; Justice, M.J.; Kozak, C.; Jemmnkins, N.A.; Copeland, 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. 149:1327, 1989.
62. Weissenbach, J.; Chernajov, Y.; Zeevi, M.; Shulman, L.; Soreq, H.; Nir, U.; Wallach, D.; Perricaudet, M.; Tiollais, P.; Revel, M.: Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies. Proc Natl Acad Sci USA. 77:7152, 1980.
63. Corbel, C.; Melchers, F.: The synergism of accessory cells and soluble α -factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. Immunol Rev. 78:51, 1984.
64. Baumann, H.; Jahreis, G.; Sauder, D.N.; Koj, A.: Human keratinocytes and monocytes release factor which regulate the synthesis of major acute phase from man, rat and mouse. J Biol Chem. 259:7331, 1984.
65. Plaut, M.; Pierces, J.H.; Watson, C.J.; Hanley-Hyde, J.; Nordan, R.P.; Paul, W.E.: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcR1 or to calcium ionopheres. Nature 339:64, 1989.
66. Van Snick, J.; Cayphas, S.; Vink, A.; Uyttenhove, C.; Coulie, P.; Simpson, R.: Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a new T cell-derived lymphokine with growth factor activity for B cell hybridomas. Proc Natl Acad Sci USA. 83:9679, 1986.
67. Aarden, L.A.; De Groot, E.R.; Schap, O.L.; Lansdorp, P.M.: Production of hybridoma growth factors by monocytes. Eur J Immunol. 17:1411, 1987.

68. Van Snick, J.; Vink, A.; Cayphas, S.; Uyttenhove, C.: Interleukin-HP1, a T cell derived hybridoma growth factor that supports the *in vitro* growth of murine plasmacytomas. *J Exp Med.* 165:641, 1987.
69. Beagley, K.W.; Eldrige, J.H.; Lee, F.; Kiyono, H.; Everson, M.P.; Koopman, W.J.; Hirano, T.; Kishimoto, T.; Mc Ghee, J.R.: Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 high rate IgA secretion in IgA-comited B cells. *J Exp Med.* 169:2133, 1989.
70. Lotz, M.; Jrik, F. Kabouridis, P, Tsoukas, C., Hirano, T.; Kishimoto, T.; Carson, D.A.: B cell stimulating factor-2/interleukin 6 is a coestimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med.* 167:1253, 1988.
71. Gauldie, J.; Richards, C.; Harnish, D.; Lansdorp, P.; Baumann, H.: Interferon betaz/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase proteins by interleukin 6 *in vivo*. *Proc Natl acad Sci USA.* 84:7251, 1987.
72. Metcalf, D.: Actions and interactions of G-CSF, LIF and IL-6 on normal and leukemic murine cells. *Leukemia.* 3:349, 1989.
73. Wong, B.G.; Witek-Giannotti, J.; Hewick, R.M.; S.C.; Clark, S.C.; Ogawa, M.: Interleukin 6: identification as a hematopoietic Colony stimulating factor. *Blood,* 75:234, 1980.
74. Kilian, P.L.; Kaffka, K.L.; Stern, A.S.; Woehle, D.; Benjamin, W.R.; dechiara, T.M.; Gubler, U.; Farrar, J.J.; Mizel, S.B.; Lomedico, P.T.: Interleukin-1 α and β bind to the same receptor on T cells. *J Immunol.* 136:4509, 1986.
75. Dinarello, C.A.; Goldin, N.P.; Woff, S.M.: Demonstration and characterization of two distinct human leucocytic pyrogens. *J Exp Med.* 139:1369, 1974.
76. Furutani, Y.; Notake, M.; Fukui, T.; Ohue, M.; Nomura, H.; Yamada, M.; Nakamura, S.: Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin-1 α . *Nucleic Acids Res.* 14:3167, 1986.
77. Clarck, B.D.; Collins, K.L.; Gandy, M.S.; Webb, A.C.; Auron., P.E.: Genomic sequence for prointerleukin-1 β ; possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin-1 α gene. *Nucleic Acids Res.* 14:7897, 1985.
78. Murphy, P.A.; Chesney, J.; Wood, W.B. Jr.; Dinarello, C.A.: Interleukin-1 induces endothelial cells synthesis of plasminogen activator inhibitor. *J Exp Med.* 163:1595, 1986.

79. Gordon, A.H.; Parker, I.D.: A pyrogen derived from human white cells which is active in mice. *Br J Exp Pathol.* 61:534, 1980.
80. Dinarello, C.A.; Clowes, G.H.A.; Gordon, A.H.; Saravis, C.A.; Wolff, S.M.: Cleavage of human interleukin-1: isolation of a peptide fragment from human plasma of febrile humans and activated monocytes. *J Immunol.* 133:1332, 1984.
81. Dinarello, C.A.: Interleukin-1. *Rev Infect Dis.* 6:51, 1984.
82. R Schindler, Dinarello, C.A.: Interleukin-1. In: *Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines.* Springer-Verlag, Berlin, 1990.
83. Besedovsky, H.; del Rey, A.: Neuroendocrine and metabolic responses induced by interleukin-1. *J Neurosci Res.* 18:172, 1987.
84. Raines, E.W.; Dower, S.K.; Ross, R.: Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblast and smooth muscle is due to PDGF-AA. *Science.* 243:393, 1989.
85. Onozaki, K.; Matsushima, K.; Aggarwal, B.B.; Oppenheim, J.J.: Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol.* 135:3962, 1985.
86. Tartakovsky, B.; Finnegan, A.; Muegge, K.: IL-1 is an autocrine growth factor for T cell clones. *J Immunol.* 141:3863, 1988.
87. Dukovich, M.; Servin, J.M.; White, S.J.; Yamazaki, S.; Mizel, S.B.: Stimulation of fibroblast proliferation and prostaglandin production by purified recombinant murine IL-1. *Clinical Immunol Immunopathol.* 38:381, 1986.
88. Dinarello, C.A.: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.* 44:153, 1989.
89. Lipsky, P.E.; Thompson, P.A.; Rosenwasser, L.J.; Dinarello, C.A.: The role of interleukin-1 in human B cell activation: inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin secreting cells by an antibody against human leukocyte pyrogen. *J Immunol.* 130:2708, 1983.
90. Lovett, D.; Kozan, B.; Hadam, M.; Resch, K.; Gemsa, D.: Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J Immunol.* 136:340, 1986.
91. Mochizuki, D.Y.; Eisenman, J.R.; Conlon, P.J.; Larsen, A.D.; Tushinsky, R.J.: Interleukin 1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:5267, 1987.

92. Zucali, J.R.; Dinarello, C.A.; Oblon, D.J.; Gross, M.A.; Anderson, L.; Weiner, R.: Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E₂. J Clin Invest. 77:1857, 1986.
93. Mendoza, J.F.; Lopez, R.; Weiss, B.: Inducción de receptores Fc y efecto proliferador de las interleucinas 1 y 2 recombinantes humanas (rhIL-1 y rhIL-2) sobre las líneas leucémicas WR19M.1 y WEHI3BD. Sangre. 36:393, 1991.
94. Adame-de León, U; Gariglio, P: Los genes del cancer. ICYT. 11:43, 1989.
95. Kunimoto, D.Y.; Nordan, R.P.; Strober, W.: IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. J Immunol. 143:2230, 1989.
96. McEnzie, D.: Alloantigen presentation by B cells. Requirement for IL-1 and IL-6. J Immunol. 141:2907, 1988.
97. Helle, M; Boije, L.; Aarden, L.A.: IL-6 is an intermediate in IL-1-induced thymocyte proliferation. J Immunol. 142:4335, 1989.
98. Navarro, S.; Debili, N.; Bernaudin, J.; Vaichenker, W.; Doly, J.: Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. J Immunol. 142:4339, 1989.
99. Mannhalter, J.W.; Wolf, H.M.; Ahmad, R.; Eibi, M.A.: The effect of Fc receptor modulation on human monocyte function. Molec Immunol. 23:1225, 1986.