Interferón y Biotecnología, Vol. 3, No. 2, 111-124 (1986)

Determinación de IL 1 usando un sistema de proliferación de timocitos

HELMUT FRIEMEL[1], MONIKA NAUSCH[1], GUSTAVO SIERRA[2] y MANUEL ARAÑA[2]

1. Instituto de Inmunología, Universidad de Rostock, RDA
2. Centro de Investigaciones Biológicas, La Habana, Cuba

Recibido el 10 de marzo de 1986

RESUMEN

La interleukina-1 (IL-1) es un factor soluble producido por células accesorias que constituye la segunda señal necesaria para la activación de células T, dependientes de macrófagos. La determinación de la IL-1 constituye un importante aspecto al medir y estudiar la inmunorreactividad *in vitro* y la presencia de este factor en fluidos corporales. En el presente trabajo se describe el método de proliferación de timocitos como sistema de medición de la IL-1 adaptado a nuestras condiciones de laboratorio, siendo demostrado que es posible usar otras especies de ratones además de la C3H/Hed (no respondedores al LPS) si se trabaja en el rango propuesto de concentración de LPS; (100 ug ml^{-1} hasta 10^{-3} ug ml^{-1}). Se presentan así mismo resultados de la valoración de otros aspectos que afectan la medición tales como: tipo y concentración de los mitógenos usados (Con A, PHA), edad de los animales, tipo y por ciento de suero añadido al cultivo, número de células y tiempo de los cultivos. Se discute la importancia de los inhibidores y las posibles fluctuaciones del test como sistema biológico.

SUMMARY

Interleukin-1 (IL-1) is a soluble factor produced by accesory cells which provides the necessary second signal for the activation of macrophage dependent T cells. The IL-1 determination represents an important aspect in order to measure and to study the immunoreactivity *in vitro* and the presence of this factor in corporal fluids. In this paper it is described the thymocytes proliferation method "coestimulator assay" as a IL-1 measurement system applied to our lab conditions. It has been demonstrated that it is possible to use not only the C3H/Hed (LPS - not responder) but also other species of mice using the tested concentration rank of LPS (100 ug ml^{-1} to 10^{-3} ug ml^{-1}). We discuss also here results on the evaluation of other aspects affecting the measurement such as: type and concentration of the used mitogens (Con A, PHA), animals age, type

Copyright © 1986, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón
Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

and percent of the serum added to the culture, cell number and time of the cultures. It is discussed the importance of the inhibitors as well as possible fluctuations of the test as a biological system.

INTRODUCCION

La interleukina-1 (IL-1) es un factor esencial en la activación de células T dependientes de los macrófagos (Mizel, 1982). Este factor fue descrito por primera vez por Gery y otros colaboradores en 1972 y calificado en aquel entonces como Factor de Activación de Linfocitos (LAF).

En 1979, con la introducción de la nomenclatura Interleukina para LAF y otros factores semejantes, se propuso la denominación IL-1 (Aarden *et al.*, 1979).

La IL-1 es segregada por células accesorias (macrófagos, monocitos, células de Langerhans, queratinocitos, astrocitos, etcétera) después de contacto antigénico o mitogénico y estimula a células T activadas para la producción de Interleukina-2 (IL-2) y para la proliferación a las células T estimuladas con IL-2.

La IL-1 purificada es heterogénea por lo menos con dos bandas de peso molecular: 13-15 KD y aproximadamente 80 KD (Lachman *et al.*, 1980; McKernan y Largen, 1983), siendo su actividad específica muy elevada pues aun en el orden de picogramos exhibe una potente acción.

La IL-1 se caracteriza por las siguientes propiedades:

in vitro

- potencia la proliferación de timocitos estimulados mitogénicamente,
- estimula la secreción de IL-2 proveniente de células T activadas,
- aumenta la formación de anticuerpos,
- actúa mitogénicamente sobre los fibroblastos,
- aumenta la liberación de factores que inhiben la migración leucocitaria, así como de factores quimiotácticos y eleva la cantidad de rosetas E activadas.

in vivo

- potencia las reacciones inmunológicas e inflamatorias,
- induce fiebre (idéntico a pirógenos endógenos),
- activa la formación de proteínas de la fase aguda inflamatoria,
- produce neutrofilia.

(Ben-Zvi *et al.*, 1981; Duff y Durum, 1982; Oppenheim *et al.*, 1982; Whicher y Chambers, 1984).

La determinación de la IL-1 permite hacer conclusiones en cuanto al grado de activación de células accesorias. Ya existen las primeras informaciones sobre las determinaciones de la IL-1 en los líquidos corporales, suero (Wood *et al.*, 1983a), sinovia extraída por punción articular (Wood *et al.*, 1983b), líquido gingival (Oppenheim *et al.*, 1982).

Como método para determinar la IL-1 se prefiere actualmente la investigación de su actividad comitogénica en timocitos de ratones utilizándose la prueba del LAF según Gery *et al.* (1972) con distintas modificaciones, junto al test de proliferación de fibroblastos (Flad y Ulmer, 1984; Scala *et al.*, 1984) y a la determinación de receptores para IL-1 en líneas celulares positivas tales como la LBRM-33 1A5 (Gillis y Mizel, 1981). Como standard de IL-1 es habitual utilizar los sobrenadantes de cultivos de leucocitos humanos o de la línea celular P-338-01 (permanente) estimulados con LPS.

A continuación se brindan nuestras experiencias en cuanto al modo de determinar la IL-1, basado en la proliferación de timocitos y adaptado a nuestras condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Medio de cultivo: RPMI 1640 (Staatliches Institut für Inmunpraparate Berlín/RDA) con las siguientes adiciones por 1 000 ml: 850 mg de $NaHCO_3$ p.a. + (Merck, Darmstadt/RFA, 2 400 mg de HEPES (ACRIS Feinchemikalien, Heidelberg/RFA), 584 mg de L (+)-Glutamina (Ferak, Berlín Occ.), 110 mg de piruvato de sodio purísimo (Serva, Heidelberg/RFA), 5 x 10^{-5} M de mercaptanoetanol (Ferak, Berlín Occ.) 100 000 UI de Penicilina G (Jenapharm, Jena/RDA) y 50 mg de estreptomicina (Jenapharm, Jena/RDA). El medio se filtra de manera estéril y se conserva en porciones de 100 ml a -20°C hasta que se utilice.

Obtención de timocitos: Se sacrifican ratones hembras, convencionales C57Bl, A/J, CBA, C3H y Balb/c, de 8-10 semanas de edad, mediante dislocación cervical, se diseca el timo bajo condiciones asépticas, si es posible sin sangramiento y se introduce en medio RPMI. Para obtener células, el tejido del timo se pasa con cuidado a través de un colador de metal, mediante inyector sin aguja.

Después se centrifugan las células en una centrífuga modelo T 23, de la fábrica Zentrifugenbau, Engelsdorf/RDA; 10 min, a 200 g y se ajustan a una concentración de 10 x 10^6 células ml^{-1}

Cultivo de timocitos: Se trasladan a tubos Eppendorf de 1.5 ml (Polyplast, HalbersTadt/RDA) 100 ml de una suspensión conteniendo 10 x 10^6 células ml^{-1} en RPMI 1640 completo más 4 por ciento de suero fetal de ternero inactivado 30' a 56°C. Se añaden 100 ml del medio antes descrito y se incuban entre 1 y 4 días a 37°C y atmósfera con 5 por ciento de CO_2. Para determinar la viabilidad se utiliza la técnica de tinción vital por azul de tripan.

Preparación del standard de IL-1

En recipientes de cristal rectangulares aptos para cultivos se incuban durante 7 días células P388D1[x] a una concentración de 1 x 10^5 células ml^{-1} en 20 ml de RPMI más 10 por ciento de suero bovino a 37°C y atmósfera de 5 por ciento de CO_2 en presencia y/o ausencia de 10 mg ml^{-1} de LPS (*E. coli* O 127; B8, Difco, Detroit/USA). Para seguir la cinética de producción de IL-1 en el cultivo se extraen diariamente 500 μl del sobrenadante.

El standard de IL-1 se logra el séptimo día con los cultivos de la línea P388D1 de ratón estimulados con LPS.

Para conseguir un standard humano de IL-1 se prepararon los leucocitos extraídos de 100 ml de sangre venosa de un donante, grupo sanguíneo AB más 1ml de heparina (Gedeon Richter Budapest/Hungría) mediante sedimentación en dextrán (Infukoll 6 por ciento, Serum-Werk Bernburg/RDA) y se incubaron 24 horas a 37°C y atmósfera de 5 por ciento de CO_2 en porciones de 20 ml de una concentración celular de 5 x 10^6 células ml^{-1} con 2 por ciento de suero fetal de ternera y 10 μg ml^{-1} de LPS. El sobrenadante de este cultivo de leucocitos se usó como standard humano de IL-1.

+ p.a.= per analise.

x Agradecemos al Dr. Kopp, Berlín-Buch, por la donación de células P388D1.

Determinación de IL-1: Se añaden en tubos Eppendorf timocitos recién preparados (ratón CBA, de 8 a 10 semanas de edad) 10 x 10^6 células ml^{-1} en RPMI con 4 por ciento de suero de ternera fetal y 16 μl ml^{-1} de Fitohemaglutinina (PHA) (Wellcome, Beckenham Inglaterra) y 100 μl de uno de los sobrenadantes standard según la prueba a realizar así como los controles y muestras a analizar. Con los sobrenadantes standard se preparan las diluciones para la curva de calibración del ensayo.

Las muestras también se analizan en diluciones sucesivas.

La concentración final de fitohemaglutinina es de 10 μl ml^{-1}. Los cultivos se incuban 3 días a 37°C y atmósfera con 5 por ciento de CO_2, después se añaden 20 μl de ^3H-timidina (Radioisótopo, Praga/RSCh), actividad específica 960GBq/mM y se vuelven a incubar otras 16 horas.

Medición de la actividad: Al efecto de obtener las alícuotas para la medición se resuspenden los cultivos mediante agitación (Presstomix, Cerco Instrumenten, Bredm/Holanda).

Se toman 100 μl de cada cultivo y se pipetean sobre un disco de papel de filtro (Ø 22 mm, no. de filtro 7, Spezialpapier fabrik Niederschlag/RDA) y se secan al aire. Después se lavan los discos de papel de filtro:

- 2 veces 5 minutos cada vez en 0,15 M de NaCl
- 2 veces 5 minutos cada vez en 300 mM de ácido tricloroacético
- 1 vez 5 minutos en metanol, después se secan al aire.

La actividad en los filtros se mide en un contador de centelleo LKB Wallac 2117 Bromma/Suecia.

La cantidad de sobrenadante de IL-1, que se necesita para inducir una proliferación de timocitos al 50 por ciento, se obtiene gráficamente en la serie de dilución log_2 y se establece como una unidad de IL-1. Si el material que se investiga no alcanza para una titulación, entonces en una dilución 1:4 se investiga la proliferación relativa en un standard de IL-1, correspondientemente diluido.

Reactividad mitogénica: Para examinar la reactividad a la Con A se utilizan timòcitos de cinco especies de ratones C57Bl, A/J. CBA, C3H, Balb/c de 8 a 10 semanas de edad. Estos timocitos se cultivan a una concentración de 5 x 10^6 células ml^{-1} con 1,3 mg ml^{-1} de Con A (Pharmacia Uppsala, Suecia) en un volumen final de 200 μl durante 3 días a 37°C y a atmósfera de 5 por ciento de CO_2. Después de cultivarlos durante 16 horas adicionales en presencia de ^3H-timidina, se mide la incorporación de radiactividad en el contador.

Para conocer la reactividad ante los LPS se cultivan durante tres días timocitos de tres especies de ratones (CBA, C3H, Balb/c) en un volumen final de 200 μl y en una concentración de 5 x 10^6 células ml^{-1} con LPS (*E. coli* 0 127:B8) dentro del rango de concentración de 10^2 μg ml^{-1} a 10^{-3} μg ml^{-1} y se cultivan 16 horas más después de añadir la ^3H-timidina.

Se ensayan seis preparados distintos de LPS dentro del rango de concentración de 100 μg ml^{-1} hasta 10^{-3} μg ml^{-1}, en timocitos de ratón CBA: los preparados usados fueron LPS de *Sh. sonnei I*, *Sal typhimurium Tm* 51516, *E. coli* RA -U, *Klebziella* 05, *Klebriella* $01^{+)}$ y *E. coli* 0 111: B4 (Difco, Detroit/USA).

Dependencia de la edad: Se preparan timocitos de ratones CBA desde 1 a 12 semanas de edad y se investigan en cuanto a su reactividad ante la IL-1: sobrenadante de P388D1-LPS a una dilución final 1:4, Con A (1.3 μg ml^{-1}) y LPS (*E. coli* 0 127: B8, 10 μg ml^{-1}).

Número de células: Para investigar la proliferación de timocitos en dependencia del número de células se emplean diferentes suspensiones de timocitos desde 1 x 10^6 células ml^{-1} hasta 6 x 10^6 células ml^{-1} en presencia de IL-1 proveniente de sobrenadante de P388D1 estimulada con LPS y sobrenadante de cultivo de leucocitos humanos estimulados con LPS, a una dilución final de 1:4.

Influencia del suero: Se investiga la proliferación de timocitos en presencia de cantidades constantes de standard de IL-1 con distintas proporciones de suero fetal de ternera (SFT), suero neonatal de ternera (ST) o suero de cordón umbilical humano (SCUH) en las concentraciones de 2, 5 y 10 por ciento.

Se determinó la concentración óptima para suero fetal de ternera tanto después de estimulación mitogénica (Con A 1.3 $\mu g\ ml^{-1}$) como también después de estimulación con IL-1 (standard humano de IL-1).

RESULTADOS

En nuestras condiciones de cultivo hallamos una viabilidad de los timocitos después de 3 días de cultivo del 50 al 60 por ciento. La proliferación de timocitos se produjo después que los cultivos fueron estimulados por ejemplo con sobrenadante conteniendo IL-1 en presencia de PHA obteniéndose una proliferación de cien veces o más en comparación con los controles no estimulados.

El standard murino de IL-1 fue obtenido de los macrófagos P388D1. La figura 1 muestra las actividades de IL-1 encontradas en sobrenadantes de P388D1, estimuladas y no estimuladas con LPS, en dependencia del tiempo de cultivo. Después de la estimulación con LPS comienza un aumento continuo de la actividad de IL-1 en el sobrenadante del cultivo; el máximo se alcanza el séptimo día.

Las células P388D1 no estimuladas también producen IL-1 en estas condiciones de cultivo pero a más bajo rendimiento, el estímulo con LPS triplica los niveles de producción de IL-1 en relación con los cultivos no estimulados.

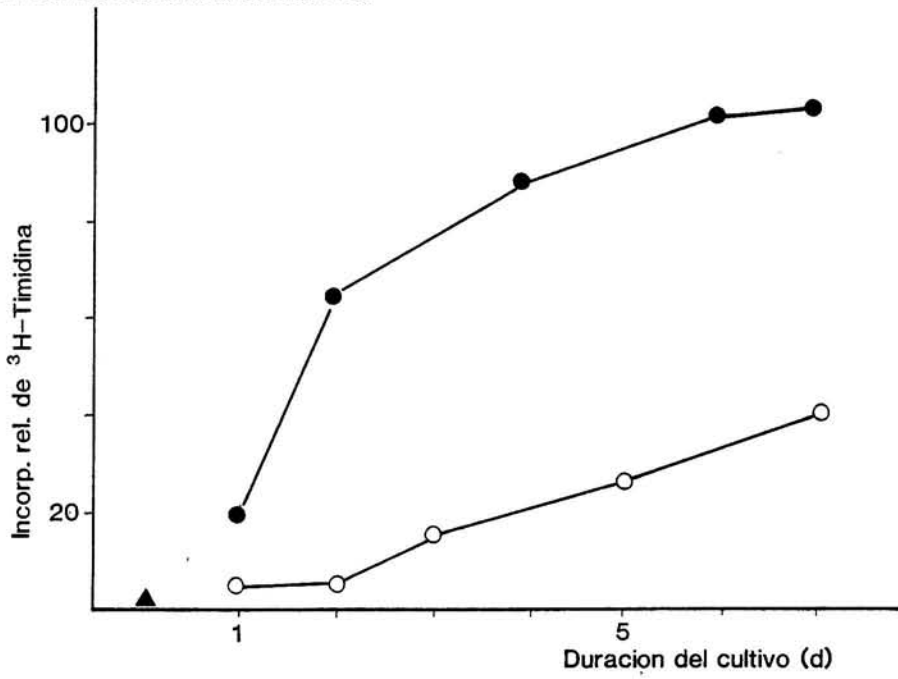

FIG. 1. Producción de IL-1, en dependencia del tiempo por la línea celular P388D1. Estimulada con LPS, O sin estimular.

En la figura 2 se presenta una curva de actividad de nuestro standard de IL-1 humana (125 U ml^{-1} de IL-1, calculada a partir del 50 por ciento de proliferación de timocitos). La actividad inhibitoria que se observa por lo regular en los sobrenadantes de cultivo desaparece generalmente a una dilución 1:4.

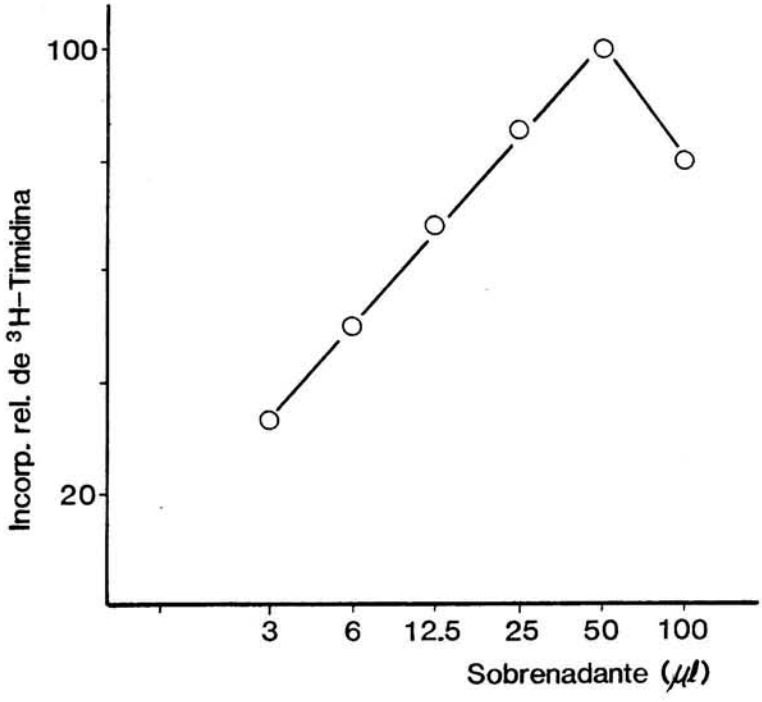

FIG. 2. Curva de actividad del sobrenadante standard. La cantidad de sobrenadante que provoca el 50 por ciento de proliferación de timocitos contiene 1 unidad de laboratorio de IL-1.

La determinación de la IL-1 descansa sobre el principio de que los timocitos estimulados con un mitógeno de células T, se potencian en presencia de IL-1. Por eso, inicialmente se investigó el comportamiento de los timocitos ante Con A y PHA. Como la secreción de IL-1 para el standard y las distintas pruebas de investigación se induce con LPS, tuvo que descartarse también una posible influencia de éste en las concentraciones elegidas sobre los timocitos investigados. La prueba de reactividad ante la Con A de timocitos de cinco especies de ratones dio como resultado niveles de estimulación muy diferentes, los más bajos en C57Bl y las más altas en Balb/c. Asumiendo que la proliferación de timocitos dependientes de Con A usando C57Bl fuera igual a 1, entonces obtendríamos las siguientes cuotas de proliferación relativa (tabla 1).

Estos resultados indican la posibilidad de obtener un sistema más o menos sensible según el rango de medición esperado.

Se verificó la reactividad ante el LPS de los timocitos en los ratones CBA, C3H y Balb/c. En nuestras condiciones, en el rango de concentración de LPS de 10^2 µg ml^{-1} a 10^{-3} µg ml^{-1} la incorporación no estaba por encima de 1 000 cpm y por tanto se hallaba dentro de los límites de los valores del blanco o control negativo. La menor reactividad de LPS se observó en los timocitos de ratones CBA.

Tabla 1

INDICE RELATIVO DE PROLIFERACION DE TIMOCITOS DE DIFERENTES ESPECIES DE RATONES*

Especie	*Indice relativo*
C57Bl	1,0
A/J	3,0
CBA	3,6
C3H	4,3
Balb/c	6,4

* Los timocitos fueron estimulados con 1,3 μg de Con A ml^{-1}.

La prueba de otros seis preparados de distinto origen de LPS en ensayos usando timocitos de CBA arrojó resultados análogos, de tal forma que se puede excluir la posibilidad de interferencias en la determinación de la IL-1 por la presencia de LPS.

La figura 3 muestra el comportamiento de timocitos de CBA ante concentraciones crecientes de Con A, PHA y LPS. El óptimo de la Con A se determinó en 1.6 μg ml^{-1} y el de la PHA en 8 μl ml^{-1}. No se pudo comprobar estimulación con LPS.

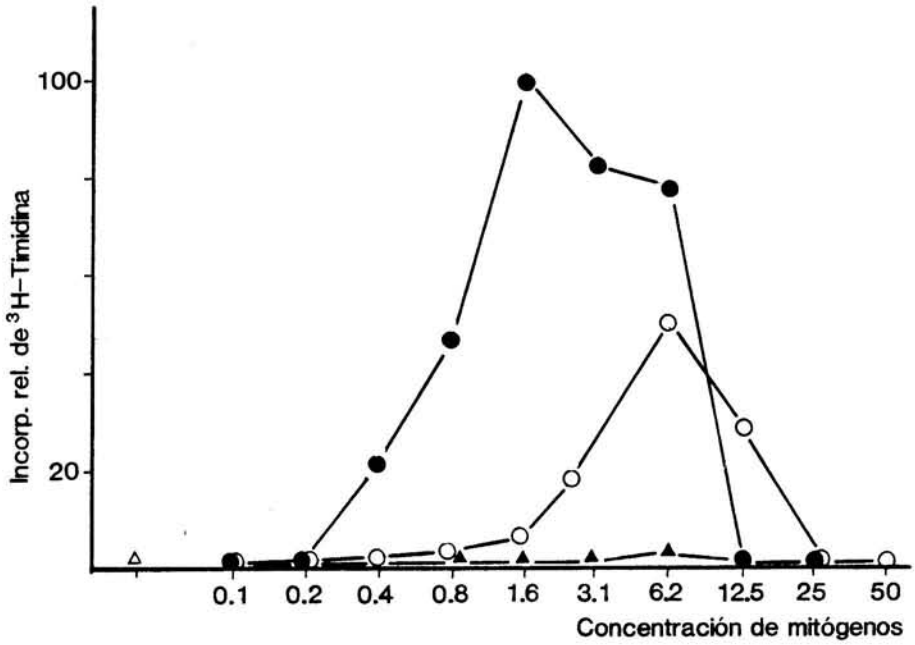

FIG. 3. Proliferación de timocitos de CBA en relación con las concentraciones de mitógenos empleadas: ▲ – estimulación con LPS; – ○ – estimulación con PHA; – ● – estimulación usando Con A.

Para investigar la dependencia que existe entre edad y proliferación de timocitos con mitógenos y la IL-1 se emplearon timocitos CBA de animales desde 1 hasta 12 semanas de edad.

Como se puede observar en la figura 4, mientras que la reactividad ante la Con A ya está bien establecida en timocitos de ratones de 2 semanas de edad, la reactividad ante la IL-1 se desarrolla mucho más despacio, lo que implica que para determinar la IL-1 se deben emplear animales con una edad mínima de 8 semanas y máximo de 10 pues ya comienza la involución tímica.

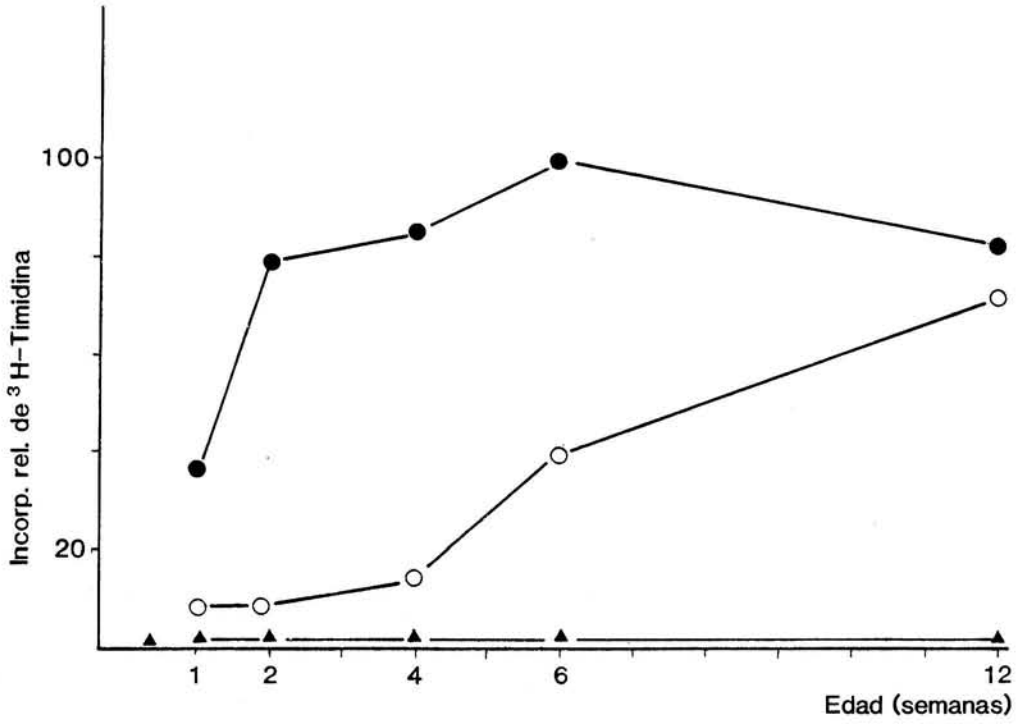

FIG. 4. Dependencia de la proliferación de los timocitos con respecto a la edad de los animales empleados: Reactividad ante Con A: – ● –; ante IL-1: – ○ –; ante medio control negativo: – ▲ –.

En la figura 5 se muestra la dependencia que existe entre la proliferación de timocitos y el número de células empleado al hacer la estimulación con 8 μl ml^{-1} de PHA constante y dos standards de IL-1.

Se observa claramente que en nuestras condiciones sólo las concentraciones de timocitos de 5 x 10^6 células ml^{-1} a 6 x 10^6 células ml^{-1} dieron como resultado proliferaciones celulares que permiten una buena evaluación.

Para estudiar la influencia de distintas adiciones de sueros sobre la proliferación de timocitos inducida por la IL-1 se emplearon SFT, ST y SCUH en las concentraciones de 2, 5 y 10 por ciento. El SFT al 2 por ciento provoca una proliferación óptima de timocitos, el ST al 2 por ciento arroja índices de incorporación evidentemente más bajos y el SCUH es inapropiado en todas las concentraciones empleadas (figura 6).

Pero si se comprueba la influencia de SFT tanto sobre la proliferación inducida por la IL-1 como sobre la inducida por Con A entonces se obtiene un comportamiento distinto de

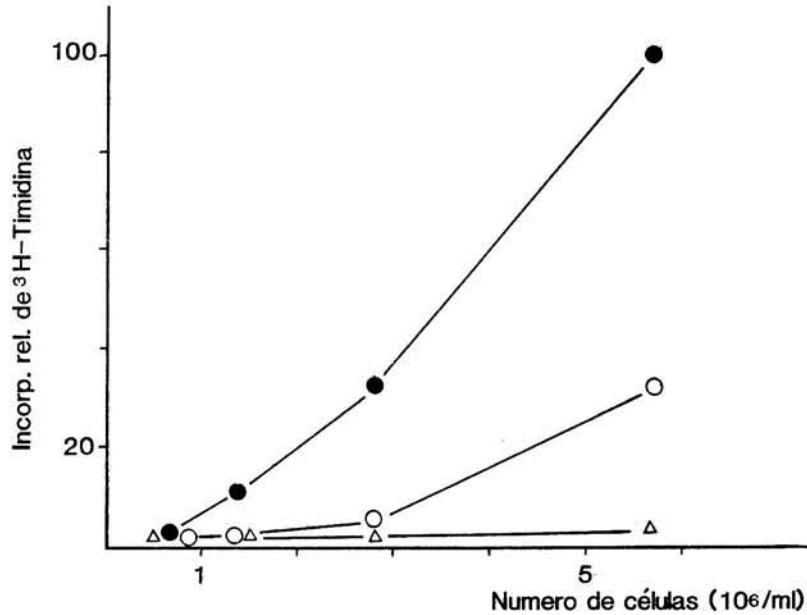

FIG. 5. Relación entre el número de células y la proliferación de timocitos:– △ – cultivo estimulado sólo por PHA;– ○ – cultivo estimulado por PHA más standard 1 de IL-1– ● – más standard 2 de IL-1.

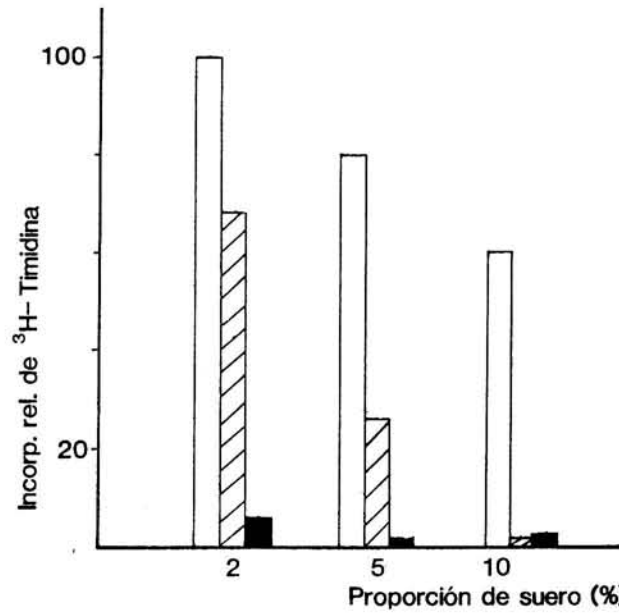

FIG. 6. Influencia de la adición de distintas concentraciones y tipos de sueros sobre la proliferación de timocitos: □ Suero Fetal de Ternera (SFT); ▨ Suero Neonatal de Ternera (ST), ■. Suero de Cordón Umbilical Humano (SCUH).

la influencia del SFT. En la proliferación inducida por IL-1, el 2 por ciento de SFT actúa óptimamente y las concentraciones de SFT más altas inhiben la proliferación; por el contrario, la proliferación inducida por Con A aumenta si la proporción de SFT es mayor (figura 7). Sería conveniente estudiar ambos efectos en rangos de concentración más amplios.

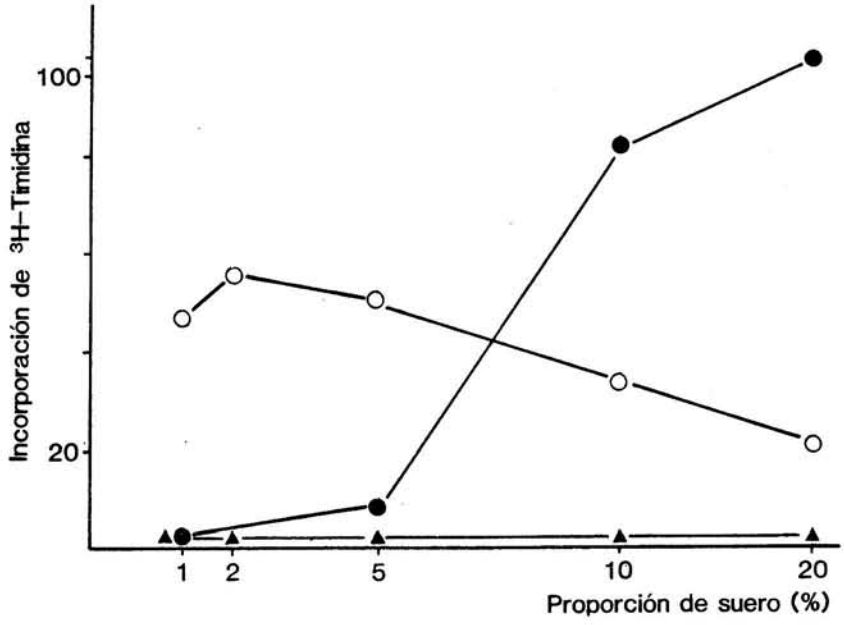

FIG. 7. Efectos comparativos de la variación del por ciento de SFT adicionado a los cultivos y la proliferación inducida por Con A (– ● –) y por IL-1 (– ○ –) respectivamente.

DISCUSION

El test más utilizado para la determinación de la IL-1 es el de la proliferación de timocitos ("coestimulator assay"). Las preparaciones de timocitos contienen menos del 1 por ciento de macrófagos, por lo tanto, son apropiadas como células blanco para la determinación de la IL-1, aunque se ha reportado por Papiernik y Homo-Delarche (1983) sobre la secreción *in vitro* de IL-1 por células fagocíticas del retículo del timo (células interdigitales). La utilización de fibroblastos para la determinación cuantitativa de IL-1 tiene la ventaja de que la IL-2 no interfiere aquí y que el Factor Mitogénico de Fibroblastos (56·Kd) no debe ser idéntico a la IL-1 (Estes *et al.*, 1984). Mientras que antes se suponía que la IL-1 (en aquel entonces LAF) era directamente mitogénica para los timocitos, actualmente se acepta que los factores mitogénicos y comitogénicos de la proliferación de timocitos representan dos actividades distintas (Smith y Ruscetti, 1981). La IL-1 no tiene ningún efecto mitogénico directo sobre los timocitos, sino que actúa como señal amplificadora secundaria en presencia de antígenos o mitógenos de

células T. Por este motivo, la determinación de la IL-1 se realiza en presencia de Con A o PHA. Como la reactividad ante la Con A de los timocitos es relativamente muy alta, utilizamos PHA óptimamente. Estas condiciones arrojan diferencias entre los controles de mitógenos y el standard de IL-1 de diez hasta cien veces y son suficientes para la determinación de la IL-1. Puede considerarse demostrado que la proliferación de timocitos dependientes de la IL-1 está mediada por la IL-2 (Oppenheim y Gery, 1982); por consiguiente el test de proliferación de timocitos mide también a la IL-2 y se puede emplear como método de determinación de la IL-2 (Bodeker y Muhlradt, 1984). Mientras que los antígenos así como los mitógenos de células T en cultivo inducen siempre a la IL-2, los LPS bacterianos actúan como inductores efectivos de la IL-1 (McKernan y Largen, 1983). Como la IL-1 inducida contiene aun después de diluida LPS, se utiliza con frecuencia para la determinación de la IL-1 el ratón C3H/Hed (no respondedor al LPS).

La verificación de distintos preparados de LPS en varias especies de ratones nos ha dado como resultado que los LPS, en el rango de concentración indicado, elevan la proliferación básica de los timocitos sólo de manera insignificante en relación con los controles, lo cual implica que también se pueden emplear timocitos de otras líneas de ratones para la determinación de la IL-1.

Las células productoras de la IL-1 no son linfocitos, sino células accesorias con la característica $OKM1^+$, DR^+ y OKT^- (marcadores en humanos) (Ruco *et al.*, 1983).

Estas células no son sólo macrófagos o bien monocitos como se suponía antes sino también una variedad de otras células que igualmente participan en la presentación de antígenos tales como: queratinocitos (Oppenheim y Gery, 1982), astrocitos (Fontana *et al.*, 1983) y células de Langerhans (Sauder *et al.*, 1984). También los linfocitos granulares grandes (llamados células L o large granular lymphocytes) que presentan el marcador humano $OKM1^+$ y que poseen actividad de células NK, segregan IL-1, *in vitro*, al ser estimuladas con LPS (Scala *et al.*, 1984).

El uso de anticuerpos monoclonales ha aportado pruebas adicionales de que la IL-1 es un producto de células accesorias y no de células T, de este modo si efectuamos la inducción en presencia del anticuerpo monoclonal anti-OKT-3 (anti-Pan T) y complemento, observamos que no se frena la producción de IL-1 a pesar de que este tratamiento debe ligar las células T presentes, mientras que anticuerpos monoclonales anti-DR inhiben tanto la secreción de IL-1 (Tsakalos *et al.*, 1984) como la proliferación de células T inducida por antígenos (Gerrard *et al.*, 1983). Las células accesorias son ricas en antígenos DR en su superficie y resultan destruidas por el tratamiento descrito anteriormente. Anticuerpos policlonales anti-IL-1 inhiben la activación de células T.

También los anticuerpos contra el pirógeno leucocitario frenan la secreción de la IL-1 (Sauder *et al.*, 1984) este hallazgo resulta de interés si tenemos en cuenta que este "pirógeno endógeno" producto de células monocitarias debe ser idéntico a la IL-1 (Sobrado *et al.*, 1983). Además ha sido comprobado por Duff y Durum (1982) que la proliferación de células T *in vitro*, inducida mediante IL-1, resulta considerablemente aumentada a una temperatura de 39°C y que la IL-1 puede inducir fiebre. Todos estos aspectos resultan de interés y deben tenerse en cuenta al realizar intentos de medición de la IL-1.

La obtención de IL-1 se produce generalmente partiendo de cultivos enriquecidos en macrófagos o monocitos estimulados con LPS o bien de líneas celulares productoras de IL-1. La línea celular P388D1 de macrófagos de ratón se usa de manera muy amplia para la obtención de IL-1, siendo posible aumentar su rendimiento mediante estimulación con acetato de forbol-meristato

(PMA: Phorbol-Merystate acetate) (Mizel *et al.*, 1978c), o también mediante una "superinducción" descrita por Mizel y Mizel (1981).

En presencia de PMA, el 90 por ciento de la IL-1 intracelular debe pasar al sobrenadante; también el Zymosan y la Sílica pueden aumentar el rendimiento de IL-1 (Lepe-Zuniga y Gery, 1984). Las primeras informaciones sobre líneas celulares humanas que producen IL-1 se publicaron recientemente por Butler *et al.* (1983) y Krakauer y Oppenheim (1983).

Se puede obtener IL-1 libre de mitógenos a partir de cultivos de P388D1 estimulados con células T activadas por PHA y lavadas (Mizel *et al.*, 1978a; Mizel *et al.*, 1978b).

Al determinarse la IL-1 a concentraciones altas de los sobrenadantes se encuentra un efecto inhibidor, de forma tal que sólo a partir de diluciones 1:2 ó 1:4 de los standards IL-1 se obtienen proliferaciones óptimas de los timocitos (figura 2). En la estimulación de células productoras de IL-1 surgen tanto actividades estimulantes como inhibitorias (Tsakalos *et al.*, 1984) de ahí que sólo se pudo comprobar la existencia de IL-1 en sueros de ratón estimulados con LPS cuando éstos estaban muy diluidos a partir de 1:64 (Wood *et al.*, 1983).

La "actividad supresora dializable" (Treves *et al.*, 1983) corresponde probablemente a la prostaglandina E_2 (PGE-2) y se puede neutralizar *in vitro* durante el proceso de obtención con 10^{-5} M de Indometacina (Cahill y Hopper, 1982; Paoiernik y Homo-Delarche, 1983). Las prostaglandinas modulan, entre otras cosas, la expresión de antígenos HLA-DR en macrófagos (Snyder *et al.*, 1982) y ejercen una retroalimentación negativa sobre la secreción de IL-1 (Paoiernik y Homo-Delarche, 1983).

También el comportamiento diferente de la proliferación de timocitos ante la adición de diferentes proporciones y tipos de sueros puede ser explicada por la presencia o no de inhibidores de la IL-1 y/o IL-2.

Hardt *et al.* (1981) describieron por primera vez un inhibidor de IL-2 no dializable en el suero del ratón.

Nosotros pudimos demostrar (trabajo en preparación) que la proliferación de timocitos condicionada por IL-1 se puede bloquear completamente si se añade 2 por ciento de suero de ratones adultos, a los cultivos de obtención; un efecto inhibidor similar se obtuvo al añadir 20 por ciento de suero humano AB.

Hasta el momento apenas existen datos en la literatura acerca de la dependencia que existe entre la edad y la proliferación de timocitos ante mitógenos o la IL-1. Nosotros encontramos que la reactividad de los timocitos de ratones ante la IL-1 se desarrolla con mucha más lentitud que su reactividad ante los mitógenos de células T (figura 4). A medida que los animales envejecen debe volver a disminuir tanto la capacidad de segregar IL-1, como también la capacidad de los blastos-T de fijar la IL-1.

Si analizamos los índices relativos de proliferación de timocitos de diferentes especies (tabla 1) podemos concluir que variando la especie donadora de los timocitos podemos disponer de un sistema más o menos sensible y aprovechar esta propiedad para ajustar el ensayo al rango de valores de concentración de IL-1 de las muestras problema.

Finalmente debe destacarse que la determinación de IL-1 mediante el test de proliferación de timocitos representa un procedimiento de determinación biológico y que a pesar de la normalización de los métodos, los valores de los blancos y controles así como las tasas de proliferación están sometidos a grandes fluctuaciones, especialmente en dependencia de la calidad del material animal utilizado, no obstante constituye una buena alternativa para determinar IL-1 aunque el objetivo final es disponer de un sistema inmunoenzimático (ELISA) específico y sólo tener que usar este tipo de ensayo para chequear la actividad biológica del material estudiado obtenido por ejemplo de clones recombinantes o purificación de materiales naturales.

REFERENCIAS

AARDEN, L. A (1979). *Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors.* Cell. Immunol. **48**: 433-436.

BEN-ZVI, A.; S. B. MIZEL y J. OPPENHEIM (1981). *Generation of human peripheral blood stable E-rosetter- forming T-cells by interleukin-1.* Clin. Immunol. Immunopathol. **19**: 330-337.

BODEKER, B. O. D. y P. F. MUHLRADT (1984). *Inhibitors regulate interleukin-2 synthesis os stimulated lymphocytes: Consequence for production procedures.* Develop. biol. Standard **55**: 247-254.

BRULEY-ROSSET, M. e I. VERGNON (1984). *Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice.* Mechanisms Againg Develop. **24**: 247-264.

BUTLER, R. H.; R. P. REVOLTELLA; P. MUSIANI y M. PIANTELLI (1983). *Constitutive production of interleukin-1 by human continuous cell line, CM-S.* Cell Immunol. **76**: 368-374.

CAHILL, J. y K. E. HOPPER (1982). *Immunoregulation by macrophages: Differential secretion of Prostaglandin E and interleukin-1 during infection with Salmonella enterititis.* Cell. Immunol. **67**: 229-240.

DUFF, G. W. y S. K. DURUM (1982). *Fever and immunoregulation: hypothermia interleukin-1 and 2 and T-cell proliferation.* Yal. J. Biol. Med. **55**: 437-442.

ESTES, J. E.; W. J. PLEDGER y G. Y. GILLESPIE (1984). *Macrophage derived growth factor for fibroblasts and interleukin-1 are distinct entities.* J. Leukocytes Biol. **35**: 115-129.

FONTANA, A.; K. P. W. J. McADAM; F. KRISTENSEN y E. WEBER (1983). *Biological and biochemical characterization of an interleukin-1- like factor from rat C_6 glioma cells.* Eur. J. Immunol. **13**: 683-689.

FLA, H. D. y H. J. ULMER. pers. Mitt (1984).

GERRARD, Th. L.; C. M. JURGENSEN y A. S. FAUCI (1983). *Differential effect of monoclonal anti-DR antibody on monocytes in antigen- and mitogen- stimulated responses: Mechanism of inhibition and relationship to interleukin-1 secretion.* Cell. Immunol. **82**: 394-402.

GRAY, I.; R. K. GERSHON y B. H. WAKSMAN (1972). *Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell.* J. exp. Med. **136**: 128-142.

GILLIS, S. y S. B. MIZEL (1981). *T-cell lymphoma model for the analysis of interleukin-1- mediated T-cell activation.* Proc. Matl. Acad. Sci. USA **78**: 1133-1137.

HAEFFNER-CAVAILLON, N.; J. M. CAVAILLON; M. MOREAU y L. SZABO (1984). *Interleukin-1 secretion by human monocytes stimulated by the isolated polysaccharide region of the Bordetella pertussis endotoxin.* Kolscular Immunol. **21**: 389-395.

HARDT, C.; M. ROLLINGHOFF; K. PFIZENMAIER; M. MOSMANN y M. WAGNER (1981). *Lyt-23$^+$ cyclophosphamide-sensitive T-cell regulate the activity of an interleukin-2 inhibitor in vivo.* J. exp. Med. **154**: 262-274.

KRAKAUER, T. y J. J. OPPENHEIM (1983). *Interleukin-1 production by a human acute monocytic leukemia cell line.* Cell. Immunol. **76**: 223-229.

LACHMAN, L. B.; S. O. PAGE y R. S. METZGAR (1980). *Purification of human interleukin-1.* J. Supramol. Structure **13**: 457-466.

LEPE-ZUNIGA, J. L. y L. GERY (1984). *Production of intracellular interleukin-1 (IL-1) by human monocytes.* Clin. Immunol. Immunopathol. **31**: 222-230.

McKERNAN, L. N. y M. T. LARGEN (1983). *Identification of multiple-molecular-weight forms of thymocyte comitogenic activity from the monocyte/macrophage cell line RAW 264.7.* Cell. Immunol. **80**: 84-96.

MIZEL, S. B. (1982). *Interleukin-1 and T-cell activation.* Immunological Rev. **63**: 51-72.

MIZEL, S. B. y D. MIZEL (1981). *Purification to apparent homogeneity of murine interleukin-1.* J. Immunol. **126**: 834-837.

MIZEL, S. B.; J. J. OPPENHEIM y D. L. ROSENSTREICH (1978). *Characterization of lymphocyte-activation factor (LAF) produced by the macrophage cell line, P388D1. Enhancement of LAP production by activated T lymphocytes.* J. Immunol. **120**: 1497-1503.

MIZEL, S. B.; D. L. ROSENSTREICH y J. J. OPPENHEIM (1978). *Phorbol myriatic acetate stimulates LAF production by themacrophage cell line P388D1.* Cell. Immunol. **40**: 230-235.

OPPENHEIM, J. J.; J. A. CHARON y T. A. LUGER (1982). *Evidence for an in vivo inflamatory role of interleukin-1 (IL-1).* Transpl. Proc. **14**: 553-555.

OPPENHEIM, J. J. e I. GERY (1982). *Interleukin-1 is more than an interleukin.* Immunol. Today **3**: 113-119.

PAPIERNIK, M. y F. HOMO-DELARCHE (1983). *Thymic reticulum in mice. III. Phagocytic cells of the thymic reticulum in culture secrete both prostaglandin E_2 and interleukin-1 which regulate thymocyte proliferation.* Eur. J. Immunol. **13**: 689-692.

RUCO, L. P.; A. STOPPACCIARO; M. VALTIERI; A. PROCOPIO; S. UCCINI y C. D. BARONI (1983). *Hairy cell leukemia: Absence of natural killer activity and of interleukin-1 release in OKM-1$^+$ spleen hairy cells.* Clin. Immunol. Immunopathol. **26**: 47-55.

SAUDER, D. N.; C. A. DINARELLO y V. B. MORHENN (1984). *Kan germans cell production of interleukin-1.* J. Invest. Dermatol. **82**: 605-607.

SCALA, G.; P. ALLAVENA; J. Y. DJEU; T. KASAHARA; J. R. ORTALDO; R. B. HEBERMAN y J. J. OPPENHEIM (1984). *Human large granular lymphocytes are potent producers of interleukin-1.* Nature **309**: 56-59.

SMITH, K. A. y F. W. RUSCETTI (1981). *T-cell growth factor and the culture of cloned functional T-cells.* Adv. Immunol. **31**: 137-175.

SNYDER, O. S.; D. I. BELLER y E. R. UNANDE (1982). *Prostaglandine modulate macrophage Ia expression.* Nature **299**: 163-165.

SOBRADO, J.; L. L. MOLDANER; B. R. BISTRIAN; C. A. DINARELLO y G. L. BLACKBURN (1983). *Effect of Ibuprofen on fever and metabolic changes induced by continuos infusion of leukocytic pyrogen (interleukin-1) or endotoxin.* Infection Immunity **42**: 997-1005.

TREVES, A. J.; V. BARAK; T. TAL y Z. FUKS (1983). *Constitutive secretion of interleukin-1 by human monocytes.* Eur. J. Immunol. **13**: 647-651.

TSAKALOS, N. D.; L. B. LACHMAN; Y. G. NEWHOUSE y R. L. WHISLER (1984). *Lipopolysaccharide (LPS) modulation of human monocyte accesory cell function in promoting T-cell colonies: Inability of LPS and IL-1 to abrogate the need for monocytes with high MLA-DR expression.* Cell. Immunol. **83**: 229-241.

WHICHER, J. y R. CHAMBERS (1984). *Mechanisms in chronic inflamation.* Immunol. Today **5**: 3-4.

WOOD, D. D.; E. J. IHRIE; C. A. DINARELLO y P. L. COHEN (1983). *Isolation of an interleukin-1- like factor from human joint effusions.* Arthritis Rheumatism **26**: 975-983.

WOOD, P. R.; L. ANDRUS e I. A. CLARK (1983). *Production of lymphocyte activating factor in vivo.* Immunology **50**: 637-644.