

Interleucina-10 y quimioprevención retinoide del cáncer de mama experimental

Drs. Tania Romero Adrián*, Marisela Corzo**, María Elena Viloría***, Rafael Molina Vílchez****, Alan Castellano*****, Jesús Estévez*****, Leonardo González*****

Cátedra de Inmunología e Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia

RESUMEN

Objetivo: Estudiar las concentraciones de interleucina-10 en el suero de ratas tratadas con 7-12 dimetil-benzantraceno, ácido retinoico y una combinación de ambos.

Ambiente: Cátedra de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biológicas y Facultad de Veterinaria. Universidad del Zulia.

Método: Investigación longitudinal, antes y después de recibir las sustancias experimentales. La citocina se cuantificó por inmunoanálisis enzimático (ELISA) de doble anticuerpo.

Resultados: Incremento de la citocina sérica en animales que recibieron la combinación (grupo A) y en los que recibieron el cancerígeno solo (grupo B), pero más significativo en los primeros. En el grupo A no se observaron tumores, pero sí en el B. El retinoide solo (grupo C) también indujo un ascenso, precoz y significativo, con descenso posterior a la normalidad, cuando aún permanecían valores elevados en los grupos A y B. No se formaron tumores en los animales del grupo C.

Conclusiones: Las dos sustancias estudiadas producen aisladamente aumento en la secreción de la citocina. Las cantidades mayores de interleucina-10, dadas sus características biológicas, parecen producir cambios en la evolución tumoral.

Palabras clave: Ácido retinoico. Cáncer. Citocinas. Interleucina-10. Glándula mamaria. Retinoides.

SUMMARY

Objective: To study interleukin-10 serum concentrations in rats treated with 7-12-dimethyl-benzanthracene, retinoic acid and a combination of both.

Setting: Chair of immunology, Institute of Biological Research and Faculty of Veterinarian Medicine. Zulia University.

Method: Longitudinal investigation before and after administration of the tested compounds. Cytokine levels were quantified using a double antibody enzymatic immunoanalysis (ELISA).

Results: Significant increase of the serum cytokine in animals receiving combined therapy (group A) and 7-12-dimethylbenzanthracene (group B), more valid in the therapy (group A) and 7-12-dimethylbenzanthracene (group B), more valid in the former. Groups A rats did not develop mammary tumors, group B did. Those treated only with retinoic acid (group C) had a significant precocious interleukin elevation, which later descended to normal values, even though groups A and B remained with higher concentrations. There was no tumor growth in group C animals.

Conclusions: Both of the tested compounds, by themselves, induced a rise of the cytokine secretion. High amounts of interleukin-10, given its biological properties, seem to produce changes in tumor evolution.

Key words: Retinoic acid. Cancer. Cytokines. Interleukin-10. Mammary gland. Retinoids.

INTRODUCCIÓN

Se ha reportado un incremento de la concentración en suero de la interleucina-10 - IL-10- en pacientes con tumores sólidos (1), lo que pudiera tener aplicación en el registro inmunológico y en la evolución de la enfermedad. Las células tumorales secretan citocinas espontáneamente, moléculas que agrupan a las interleucinas -IL, interferones -IFN-, factores

*Médica jefa del Posgrado de Inmunología. Facultad de Medicina, LUZ.

**Magister en Inmunología Experimental.

***Médica del Instituto de Investigaciones Biológicas.

****Médico gineco-obstetra.

*****Médico director del Instituto de Investigaciones Biológicas.

*****Médico del Instituto de Investigaciones Clínicas.

*****Médico oncólogo.

Esta investigación ha sido financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y humanístico (Condes) de la Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

estimulantes de colonias –CSF-, factores de necrosis tumoral –TNF- y factores de crecimiento –GF-. Algunas citocinas han sido ensayadas en tratamientos anticancerosos (2-5).

La IL-10 es una citocina inmunorreguladora, inhibidora de la secreción de otras citocinas, que regula negativamente la actividad de las células Th1 cooperadoras e inflamatorias con disminución de la IL-2 y el IFN- γ (6), mientras que, según algunos investigadores, estimula otras funciones, como la actividad de las células asesinas naturales o NK (7,8), promoviendo la defensa contra tumores e infecciones virales. Paradójicamente, Oppenheim y col. sostienen que la IL-10 inhibe la secreción de citocinas por las células NK (9). Además, en ratones, la IL-10 estimula la producción de anticuerpos de la subclase IgG-1, los cuales se unen a antígenos tumorales, haciéndose posible el acoplamiento de los receptores de las NK a la porción FC de la inmunoglobulina, con lo que se determina la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (10). Kundu y col. (8) han demostrado el efecto antitumoral y antimetastásico de la IL-10, al trabajar con líneas celulares de tumores mamarios altamente malignos, “transfectadas” con plásmidos con la citocina o sin ella, para inoculación posterior a animales competentes o comprometidos en su inmunidad. Los inóculos con IL-10 inhibieron totalmente el crecimiento tumoral en los inmunocompetentes, no ocurriendo así cuando carecían de ella. En los inmunocomprometidos el crecimiento de los tumores fue menor, y la proporción de metástasis cayó en 90% en los que recibieron la interleucina, en comparación con el grupo al cual no se la administró. Los que no la recibieron desarrollaron metástasis pulmonares y murieron entre 40 y 50 días pos-inoculación. La conclusión de esos trabajos (8) es que la IL-10 es un potente agente antimetastásico, aún en sujetos inmunocomprometidos, dependiente en esto de la actividad de NK, pero relativamente independiente del funcionamiento de linfocitos T. La influencia que cualquier tipo de terapia antitumoral tenga en la secreción de IL-10 es, por tanto, digna de ser estudiada.

Los retinoides análogos de la vitamina A o retinol (11), han sido atractivo objeto de investigación en la quimioprevención (intervención terapéutica sobre los estadios de iniciación y promoción de la carcinogénesis). De varios tipos de tumores malignos, incluido cáncer mamario (12-16). Contra éste se han hecho ensayos con el all-trans-ácido

retinoico (AR) su fotoisómero 13-cis-ácido retinoico (cAR) o isotretinoin, el Ro 40-8757 (17) y el fenretinide o 4-hidroxiifenilretinamida (18,19) entre otros. Fisiológicamente juegan un papel importante en la maduración crecimiento y diferenciación celular (20), así como en la visión, reproducción y función inmune (13). El AR es un metabolito del retinol natural, al cual puede sustituir en muchas de las funciones vitamínicas, más no en las involucradas con la visión y la reproducción (21). Pero los efectos indeseables que provocan los retinoides limitan el uso en humanos, reservándolo a pocas indicaciones como la psoriasis. Unos mil quinientos retinoides se han sintetizado, en la búsqueda de moléculas con mayor eficacia y menos efectos colaterales. Algunos resultados clínicos como los obtenidos con el isotretinoin en la aparición de segundos tumores en paciente tratados por carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (22), estimulan nuevas investigaciones.

Hay varios reportes que señalan elevadas tasas de remisión en leucemia aguda promielocítica y en la mielocítica juvenil tratadas con AR (23-25). Con la misma sustancia se ha demostrado, en ratas que los cánceres mamarios inducidos por N-metil-N-nitrosourea disminuyen la tasa de crecimiento, aunque sin reducción del tamaño de las lesiones (26). Pero Teelmann y col. (17) investigando carcinoma mamario en múridos han concluido que ni el derivado all-trans ni el 13-cis tienen efectos antitumorales a dosis tolerables por los animales. La reducción tumoral fue evidente en 4 a 6 semanas, pero debía suspenderse la terapia a la semana 6, a causa de la aparición de severa toxicidad esquelética y deterioro general.

Las conclusiones finales en cuanto a quimioprevención mamaria y retinoides no están dadas aún. En este trabajo se investigan los efectos del AR sobre los niveles de IL-10 en suero, en animales con cáncer mamario experimentalmente inducido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 24 ratas divididas 3 grupos: A (n = 8), B (n = 7) y C (n = 9). Eran hembras vírgenes Sprague Dawley de 35 días de edad al comienzo del experimento. A las de los grupos A y C se les administró por vía intragástrica AR (Vesanoid, Laboratorios Hoffman-Roche), a la dosis de 3 mg/kg de peso/día durante 30 días consecutivos. A las de los grupos A y B se les trató de inducir cáncer

mamario con 7-12-dimetil-benzantraceno o DMBA (*Eastman Organic Chemical New York*) a razón de 8 mg/100 g de peso en una sola dosis intragástrica, unas semanas después de haber terminado la terapéutica con ácido retinoico de manera que el grupo A recibió AR y DMBA, el B sólo DMBA y el C sólo AR. El DMBA se administró en el Instituto de Investigaciones biológicas de la Facultad de Medicina (Laboratorio de Biología del Cáncer). Todos los animales se investigaron simultáneamente.

Las ratas fueron obtenidas del bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y trasladados al de la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Zulia. Después de un período de adaptación ambiental, alimentadas con ratarina y agua potable *ad libitum* eran pesadas diariamente. Para medir IL-10 en suero se tomó la primera muestra, M1, el día 0. La segunda se tomó después de terminada la administración de AR (día 30, M2). Las muestras 3 y 4 fueron extraídas después del DMBA, en los días 90 y 150. Se hacía palpación mamaria a diario, en búsqueda de la aparición y evolución de tumores. A los 270 días de la M1 se extrajo la M5. Y los animales fueron sacrificados.

Se obtenía 1 ml de sangre de la cola con aguja de tuberculina. El suero era separado por centrifugación a 1 000 g, durante 10 minutos, para ser repartido en alícuotas colocadas en tubos plásticos que se almacenaron a -70°C .

La concentración de citocina se cuantificó por técnica de inmunoanálisis enzimático (ELISA) de doble anticuerpo (Mouse ELISA endógeno interleukin-10 "kit" número 013176), descrita con anterioridad (27).

Los resultados se expresaron pg/ml. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y covarianza. Si estos estudios mostraban diferencias significativas entre los grupos, se empleaba como "post-test" el análisis de múltiples comparaciones de Tukey. Se consideraron como significativos los valores de probabilidad menor de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 y Figura 1 se demuestran las concentraciones séricas de IL-10 en los diferentes grupos de experimentación, de acuerdo al tiempo de recolección de las muestras. No hay significación estadística en las diferencias de M1 en los tres grupos. En la M2 hubo un ascenso válido de IL-10 en uno de los grupos tratados con AR ($p < 0,001$), el

C. En el grupo A, también de AR pero combinado con DMBA hubo igualmente una elevación pero ésta no tuvo significación. El grupo B, que recibía DMBA sin protección retinoide tuvo un incremento significativo de la citocina ($p < 0,01$). En la misma M2, hubo incremento significativo en el grupo C con respecto al B ($p < 0,01$).

Cuadro 1

Concentraciones séricas de IL-10 en ratas tratadas con ácido retinoico y DMBA

Nº de muestra	Grupo		
	A	B	C
M1	27,0 ± 7,3	17,3 ± 4,3	34,3 ± 3,2
M2	87,1 ± 15,5 ^c	55,5 ± 5,1 ^c	161,6 ± 33,1 ^{ab}
M3	155,8 ± 33,4 ^{bd}	71,3 ± 14,1 ^f	32,8 ± 8,6
M4	10,9 ± 2,2	17,7 ± 2,3	16,1 ± 1,2
M5	30,3 ± 3,8	21,2 ± 4,9	31,5 ± 4,8

^aDiferente significativamente del grupo B ($p < 0,01$).

^bDiferente significativamente de los grupos B ($p < 0,05$) y C ($p < 0,01$).

^cDiferente significativamente de la Toma 4 ($p < 0,05$).

^dDiferente significativamente de las Tomas 1, 4 y 5 ($p < 0,001$).

^eDiferente significativamente de las Tomas 1, 4 ($p < 0,01$) y 5 ($p < 0,05$).

^fDiferente significativamente de las Tomas 1, 4 y 5 ($p < 0,001$).

^gDiferente significativamente de las Tomas 1, 3, 4 y 5 ($p < 0,001$).

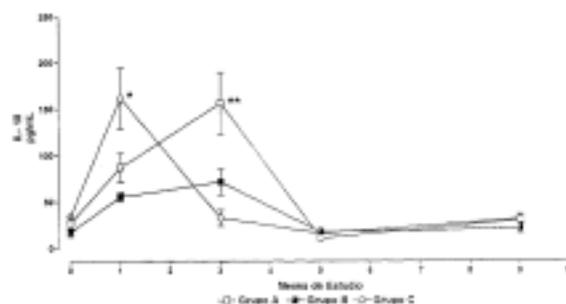


Figura 1. Concentraciones séricas de IL-10 en ratas tratadas con ácido retinoico y DMBA.

La M3, del día 90, tuvo como resultado un descenso importante en las concentraciones de la citocina del grupo C, que volvieron a los niveles iniciales, cifras muy por debajo de las correspondientes al grupo A. Los valores del grupo B fueron inferiores a los del A, con $p < 0,05$. Hubo asimismo un incremento significativo en el grupo A con respecto al B ($p < 0,05$) y al C ($p < 0,01$).

Para M4 y M5 (días 150 y 270), las concentraciones vuelven a ser similares en los tres grupos y a M1, pero hay variantes en la relación entre las diferentes muestras del mismo grupo. En el grupo A, M4 y M5 tienen descenso muy significativo respecto a M3 ($p < 0,001$), igual que sucede con M4 y M2. En el grupo B, M4 se iguala a M1, pero tiene diferencia válida con M2 y M3; y M5 es muy diferente a M3 ($p < 0,01$). En el grupo C, M4 y M5 difieren con significación de M2 ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Los retinoides actúan sobre la promoción de tumores y modifican algunas de las propiedades de las células malignas, por activación o represión de genes específicos, después de formar un complejo molecular con uno de los receptores, que se agrupan en la superfamilia de receptores esteroide-tiroidea (28). Los efectos beneficiosos potenciales han sido clasificados en: a. Inducción directa de la diferenciación celular, cuyo prototipo son las experiencias con la línea promielocítica (HL-60) de leucemia (13,29); b. Inhibición directa del crecimiento sin diferenciación; c. Inhibición del crecimiento o la diferenciación con agentes paracrinos como mediadores; d. Inducción de la diferenciación en combinación con otros agentes diferenciadores y citocinas; y e. Inducción de la apoptosis (13).

En la experiencia presente se observó un aumento de las concentraciones de IL-10 en la M3 del grupo A, bajo la combinación AR-DMBA. La IL-10 es importante porque estimula las células asesinas naturales o NK (7,8), que son efectoras en la destrucción de células tumorales. Con AR se ha descrito un aumento en la actividad de NK en pacientes que reciben β -caroteno (30). Nuestro grupo A bajo protección retinoide, no desarrolló cáncer mamario (datos no publicados).

Entre otras funciones del AR sobre el sistema inmunitario se citan: incremento de la respuesta de anticuerpos a una variedad de antígenos (13,30,31);

de la respuesta inmune mediada por células *in vivo* (31,32); activación y proliferación de linfocitos T inducida por antígeno (33) y proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos (13,34); aumento de la infiltración de células del hospedero en tumores trasplantados o químicamente inducidos (33); inducción de la síntesis de prostaglandinas (33,35); estimulación de los macrófagos para la fagocitosis (34); incremento de la expresión de marcadores de activación en células monocucleares de sangre periférica humana (36); estímulo de la expresión de IL-2 en timocitos activados (37); y aumento de la actividad de células asesinas activadas por linfocina (38).

Otras citocinas diferentes a la IL-10 parecen estar involucradas en acciones como la inducción de diferenciación celular, sumadas al AR. El IFN- γ y el TNF- α son cooperadores del AR en la inducción de la diferenciación granulocítica de las células HL-60 (13). La combinación de retinoides e IFN- α ejerce una acción inhibitoria del crecimiento e inductora de la diferenciación de líneas celulares de leucosis mieloide aguda, superior a la de cualquiera de los dos agentes por separado (39,40). El factor estimulante de colonias de granulocitos o G-CSF también induce maduración de células de leucosis (41), y potencia la diferenciación inducida por retinoides en las líneas HL-60 y U-937 (39). La IL-1, la IL-4 y el GM-CSF, también sinergizan la actividad retinoide en la diferenciación de la HL-60. El IFN- α potencia el efecto diferenciador retinoide sobre células de neuroblastomas y tanto él como el IFN- γ , sobre todo este último, refuerzan la acción diferenciadora inducida por AR en cáncer mamario (13,42). El AR provoca la apoptosis de células tumorales, mecanismo de acción óptima para una terapia de diferenciación, por inducción de la síntesis de citocinas del grupo del factor de crecimiento transformante β , o TGF- β (13).

En el grupo B, con DMBA sin protección retinoide aunque hubo ascenso significativo de las concentraciones de IL-10 en M2 y M3 con relación a M1 éste no alcanzó los niveles del grupo A (AR y DMBA) ni los del C (AR) en M2. En la M3, sin embargo, las concentraciones bajaron para el C, probablemente porque al no existir un estímulo adicional de importancia, la IL-10 inhibe su propio ARNmensajero (43). Carson y col.(7) sostienen que la IL-10 es capaz de inducir actividad citolítica significativa de NK contra células tumorales previamente resistentes a NK, en una forma dependiente

de la dosis. El aumento de la IL-10 en el presente trabajo, en los grupos que recibieron DMBA más AR y ambas sustancias solas, apoya la idea de que las dos son estimulantes de la producción de la citocina, y que sus acciones son sinérgicas. En el grupo con AR y DMBA ascendió más la interleucina y no se formaron tumores. En el que recibió el cancerígeno sin los beneficios preventivos del retinoide, el incremento ocurrió pero en menor intensidad y se desarrollaron tumores (datos no publicados). El descenso brusco de la IL-10 en la M3 del grupo C, sugiere la acción autorreguladora de la propia interleucina. La vuelta a los valores iniciales de IL-10 en M4 y M5 para todos los grupos hace pensar que la respuesta tanto al cancerígeno como al retinoide, cambia ostensiblemente con la desaparición del estímulo al ser metabolizadas esas sustancias. Kundu y col. (8) han demostrado que la expresión de la IL-10 inhibe totalmente el crecimiento primario de tumores de mama trasplantados altamente malignos e inmunogénicos; y lo hace parcialmente en aquellos de poca inmunogenicidad, apoyando los informes de referencias previas (44-45). El efecto no está restringido al tipo de tumor puesto que se logra por igual en gliosarcoma. De particular importancia es la demostración del efecto antimetastásico de la citocina.

Los resultados aquí presentados además de corroborar el efecto protector de la quimioprevención retinoide (el ascenso de la IL-10 parece formar parte de tal acción), apoyados en los de Kundu y col. (8), abren la posibilidad de una línea de investigación sobre el uso de la IL-10 recombinante como terapia alternativa, sola o en combinación con el AR. La administración sistémica de IL-10 a diferencia de la de otras citocinas, no es tóxica (46-47).

REFERENCIAS

- Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, et al. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumors. *Cancer Letter* 1996;104:1-5.
- Fearon ER, Pardoll DL, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, et al. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990;60:397-403.
- Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989;57:503-512.
- Porgador A, Tzehoval E, Katz A, Vadai E, Revel M, Feldman M, et al. Interleukin-6 gene transfection into Lewis lung carcinoma tumor cells suppresses the malignant phenotype and confers immunotherapeutic competence against parental metastatic cells. *Cancer Res* 1992;52:3679-3686.
- Brunda MG, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, et al. Antitumor and antimetastatic activity of IL-12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-1230.
- Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin-10. *Immunol Today* 1992;13:198-200.
- Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett R, Tan JC, Chu Chou C, et al. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 1995;85:3577-3585.
- Kundu N, Beaty TL, Jackson MJ, Fulton AM. Antimetastatic and antitumor activities of interleukin-10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:536-541.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Citocinas. En: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editores. *Inmunología básica y clínica*. 8ª edición. México DF: Edit El Manual Moderno; 1996.p.133-155.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 2ª edición. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; 1995.
- Pawson BA. A historical introduction to the chemistry of vitamin A and its analogues (retinoids). *Ann NY Acad Sci* 1981;359:1-8.
- Sporn MB, Newton DL. Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* 1979;38:2528-2534.
- Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA. Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* 1992;10:839-864.
- Chang J, Powles T. Breast cancer chemoprevention. En: Bonadonna G, Hortobagyi GN, Gianni AM, editores. *Textbook of breast cancer*. Reimpresión. Londres: Martin Dunitz; 1998.p.335-340.
- Kurie JM, Lee JS, Griffin T. Phase I trial of 9-cis-retinoic acid in adults with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1996;2:287-293.
- Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 1997;278:1073-1077.
- Teilmann K, Tsukaguchi T, Klaus M, Eliason JF. Comparison of the therapeutic effects of a new arotinoid, Ro 40-8757, and All-trans and 13-cis retinoic acids on rat breast cancer. *Cancer Res* 1993;53:2319-2325.
- Costa A. Breast cancer chemoprevention. *Eur J Cancer* 1993;29:589-592.
- Moon RC, Thompson HJ, Becci PL. N-(4-Hydroxy-

INTERLEUCINA-10 Y QUIMIOPREVENCIÓN

- phenyl) retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer. *Cancer Res* 1979;39:1339-1346.
20. Meyskens FL. Modulation of abnormal growth by retinoids: A clinical perspective of the biological hormone phenomenon. *Life Sci* 1981;28:2323-2327.
 21. Chytil F. Retinoic acid: Biochemistry and metabolism. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:741-747.
 22. Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, et al. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1990;323:795-800.
 23. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Amar M, Bernard JF, Boivin P, et al. Retinoic acid therapy for promyelocytic leukemia. *Lancet* 1989;ii:746-747.
 24. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* 1990;76:1704-1709.
 25. Iversen PO, Hart PH, Bonder CS, López AF. Interleukin (IL)-10, but not IL-4 or IL-13, inhibits cytokine production and growth in juvenile myelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 1997;57:476-480.
 26. Lacroix A, Doskas C, Bhat PV. Inhibition of growth of established N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer in rats by retinoic acid and ovariectomy. *Cancer Res* 1990;50:5731-5734.
 27. Romero Adrián T, Ruiz A, Molina Vílchez R, González E, Taborda JL, Estévez J. Concentraciones séricas de interleucina-2 en el embarazo normal. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1999;59:3-6.
 28. Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1998;240:889-894.
 29. Collins S. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood* 1987;70:1233-1244.
 30. Spitznagel J, Allison A. Mode of action of adjuvants: Retinoid and other lysosome-labilizing agents as adjuvants. *J Immunol* 1970;104:119-127.
 31. Jurin M, Tannock I. Influence of vitamin A on immunological response. *Immunology* 1972;23:283-287.
 32. Athanassiades T. Adjuvant effect of vitamin A palmitate and analogs on cell-mediated immunity. *J Nat cancer Inst* 1981;67:1153-1156.
 33. Eccles S. Effects of retinoids on growth and dissemination of malignant tumors: Immunological considerations. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1599-1610.
 34. Dillehay D, Walia A, Lamon E. Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *J Leuk Biol* 1988;44:353-360.
 35. Takenaga K. Stimulation by retinoid acid of prostaglandin production and its inhibition by tumor promoters in mouse myeloid leukemia cells. *Gann* 1981;72:488-497.
 36. Prabnala R, Maxey V, Hicks M. Enhancement of the expression of activation markers on human peripheral blood mononuclear cells by in vitro culture with retinoid and carotenoids. *J Leuk Biol* 1989;45:249-254.
 37. Sidell N, Ramsdell F. Retinoic acid upregulates interleukin-2 receptor on activated human thymocytes. *Cell Immunol* 1988;115:229-309.
 38. Lin T, Chu T. Enhancement of murine lymphokine-activated killer cells activity by retinoic acid. *Cancer Res* 1990;50:3013-3018.
 39. Peck R, Bollag W. Potentiation of retinoid-induced differentiation of HL-60 and U-937 cell lines by cytokines. *Eur J Cancer* 1991;27:53-57.
 40. Hemmi H, Breitman T. Combination of recombinant human interferons and retinoic acid synergistically induce differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Blood* 1987;69:501-507.
 41. Nicola N. Granulocyte colony-stimulating factor and differentiation-induction in myeloid leukemia cells. *Int J Cell Clon* 1987;5:1-15.
 42. Tarth C, Daxenbichler G, Dapunt O. Synergistic antiproliferative effect of human recombinant interferons and retinoic acid in cultured breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:1197-1202.
 43. Borisch L. Updates on cells and cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:293-297.
 44. Richter G, Kruger-Krasagakes S, Hein G, Huls C, Schmitt E, Diamantstein T, et al. Interleukin-10 transfected into chinese hamster ovary cells prevents tumor growth and macrophage infiltration. *Cancer Res* 1993;53:4134-4137.
 45. Allione A, Consalvo M, Nanni P, Lollini PL, Cavallo F, Giovarelli M, et al. Immunizing and curative potential of replicating and non-replicating murine mammary adenocarcinoma cells engineered with IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, tumor necrosis factor α , granulocyte-macrophage stimulating factor and γ -interferon gene or admixed with conventional adjuvants. *Cancer Res* 1994;54:6022-6026.
 46. Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 1993;23:3043-3049.
 47. Chernoff AE, Granowitz EW, Shapiro L, Vanier E, Lonnemann G, Angel JB, et al. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune response. *J Immunol* 1995;154:5492-5499.